DNS-bindende Kernproteine bei dem hypotrichen Ciliaten Stylonychia lemnae

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Wolfram Steinhilber
aus Reutlingen

1983

UNIV.
LEIDEN
KBL

DNS-bindende Kernproteine bei dem hypotrichen Ciliaten Stylonychia lemnae

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Wolfram Steinhilber
aus Reutlingen

1983

Tag der mündlichen Prüfung:	15. Dezember 1983
Dekan:	Prof. Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. H.J. Lipps
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Ammermann

Ich fühl's, vergebens hab ich alle Schätze
Des Menschengeists auf mich herbeigerafft,
Und wenn ich mich am Ende niedersetze,
Quillt innerlich doch keine neue Kraft;
Ich bin nicht um ein Haar breit höher,
Bin dem Unendlichen nicht näher.

(Goethe, Faust I)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536509_0007

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. H.J. Lipps am Institut für Biologie III, Lehrstuhl Zoologie, Abteilung Zellbiologie, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas und die jederzeit hervorragende und geduldige Unterstützung möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. H.J. Lipps besonders danken.

Herrn Dr. G. Steinbrück danke ich für die hilfreiche Unterstützung.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Zellbiologie danke ich für das gute und kurzweilige Zusammenarbeiten, besonders bei H.P. Beck, S. Feiler und A. Kurz.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	6
2.1.	Untersuchungsobjekt	6
2.1.1.	Kulturbedingungen	6
2.2.	Lösungen	6
2.3.	Kernisolierungen	10
2.3.1.	Isolierung von Makronuklei	10
2.3.2.	Isolierung von Makronukleusanlagen	10
2.3.3.	Isolierung von Mikronuklei	11
2.3.4.	Chromatinisolierung aus Makronuklei	11
2.4.	Proteinaufarbeitung	12
2.4.1.	Gesamtkernproteine	12
2.4.2.	Proteine des Chromatins aus Makronuklei	12
2.4.3.	Proteinmengenbestimmung	13
2.4.3.1.	Proteinmengenbestimmung in verdünnter Lösung	13
2.5.	DNS-Isolierungen	13
2.5.1.	DNS aus Makronuklei und Makronukleusanlagen	13
2.5.1.1.	TCA-Fällung von DNS	14
2.5.2.	Plasmid-DNS - Isolierung	15
2.5.2.1.	Großmengenisolierung (Cleared-Lysate Methode)	15
2.5.2.2.	Schnellisolierung von Plasmid-DNS	16
2.6.	Gelelektrophoresen	16
2.6.1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	16
2.6.2.	Agarosegelelektrophorese	17
2.7.	Transfer-Methoden	17
2.7.1.	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosefilter	17

		Seite
2.7.1.1.	Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosefiltern	18
2.7.2.	Transfer von DNS auf Nitrocellulosefilter (Southern-Blot)	19
2.8.	Radioaktive Markierung von DNS	20
2.8.1.	Nick-Translation	20
2.8.2.	3'-Endmarkierung	21
2.8.3.1.	Dephosphorylierung von DNS	21
2.8.3.2.	5'-Endmarkierung	22
2.9.	DNS-DNS - Hybridisierungen	22
2.10.	DNS-Protein - Bindungen	23
2.10.1.	DNS-Protein - Bindungen bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen	24
2.11.	Verdau von DNS mit Nukleasen	24
2.11.1.	Nuklease Bal-31 - Verdau von Ma-DNS	24
2.11.2.	Nuklease S1 - Verdau von Ma-DNS	25
2.11.3.	Verdau mit Restriktionsendonukleasen	25
2.11.3.1.	Pst I	25
2.11.3.2.	Hind III, Bam HI und Bgl I	26
2.11.3.3.	Eco RI	26
2.11.3.4.	Sal I	26
2.11.3.5.	Alu I und Hae III	27
2.12.	DNS-Bandenisolierung aus LOW-MELTING Agarosegelen	27
2.13.	Protein-Bandenisolierung aus SDS-Polyacrylamidgelen	28
2.14.	Klonierung von Ma-DNS - Stücken in pBR 322	29
2.14.1.	G-Tailing von pBR 322	29
2.14.2.	C-Tailing von Ma-DNS - Genstücken	30
2.14.3.	Reannealing	30
2.14.4.	Transformation von pBR 322 in E. coli	31
2.15.	Elektronenmikroskopische Darstellung von DNS-Protein-Komplexen	32

		Seite
3.	Ergebnisse	33
3.1.	Proteinisolierungen	33
3.1.1.	Makronukleusproteine	34
3.1.2.	Proteine von isoliertem Chromatin aus Makronuklei	34
3.1.3.	Makronukleusanlagenproteine	35
3.1.4.	Mikronukleusproteine	36
3.2.	Proteintransfer auf Nitrocellulosefilter (Western-Blotting)	38
3.3.	DNS-Protein - Bindungsversuche	39
3.3.1.	Bindung von Gesamt-Ma-DNS an MaP und AnlP	39
3.3.2.	Bindung von MaAnl-DNS an MaP und AnlP	40
3.3.3.	Bindung von Kalbsthymus- und E. coli-DNS an MaP und AnlP	40
3.3.4.	Bindung von Gesamt-Ma-DNS an MaP bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen	42
3.3.5.	Bindung von Ma-Genstücken an MaP	44
3.3.6.	Bindung von Z-DNS an MaP	47
3.3.7.	Bindungen mit Bal-31 verdauter Ma-DNS an MaP	48
3.3.7.1.	Bindungsversuche zu 3.3.7. mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen	52
3.3.7.2.	Bindungsversuche zu 3.3.7. mit Nuklease S1 verdauter Ma-DNS	54
3.3.7.3.	Bindungen zu 3.3.7. mit Ma-Genstücken aus 3.3.5.	54
3.3.7.4.	Elektronenmikroskopische Darstellung der Bindung von Gesamt-Ma-DNS mit dem 80 kd-Protein	57
3.3.8.	Bindung mit terminaler C_4A_4-Sequenz an MaP	59
3.3.8.1.	Elektronenmikroskopische Darstellung der Bindung der terminalen C_4A_4-Sequenz mit dem 40 kd-Protein	63

Seite

4. Diskussion 65

5. Zusammenfassung 77

6. Literaturverzeichnis 79

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AnlP	Proteine aus Makronukleusanlagen
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CIP	Calf intestinal alkaline phosphatase
°C	Temperatur in Grad Celsius
cpm	counts per minute
d	Dalton
DNase	Deoxyribonuklease
dATP	Deoxy-Adenosin-5'-triphosphat
dCTP	Deoxy-Cytidin-5'-triphosphat
dGTP	Deoxy-Guanosin-5'-triphosphat
dTTP	Deoxy-Thymidin-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EM	Elekronenmikroskop
h	Stunde
kb	Kilobasen(paare)
kd	Kilodalton
KT-DNS	Kalbsthymus-DNS
Lys A	Lysiermedium A
Ma-DNS	Makronukleus-DNS
MaAnl-DNS	Makronukleusanlagen-DNS
$Ma\text{-}DNS_{Bal\text{-}31}$	Makronukleus-DNS, verdaut mit der Exonuklease Bal-31 (2.10.1.)
MaP	Proteine aus Makronuklei
Mi-DNS	Mikronukleus-DNS
MiP	Proteine aus Mikronuklei
min	Minute
µCi	Mikrocurie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mg	Milligramm

ml	Milliliter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
OD_{260}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm
PbP	Proteinbindungspuffer
RNase	Ribonuklease
S1-Ma-DNS	Makronukleus-DNS verdaut mit Nuklease S1 (2.11.2.)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SS	einzelsträngige DNS
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	units (Enzymeinheiten)
Upm	Umdrehungen pro minute
V	Volt
Vol.	Volumen (Volumina)

1. Einleitung

Die Ciliaten sind durch einen Kerndimorphismus mit generativen Mikronuklei und einem vegetativen Makronukleus besonders gekennzeichnet. Bei der geschlechtlichen Fortpflanzung (Konjugation) gehen die Makronuklei zugrunde und nach Durchlaufen der Meiose teilt sich je ein haploider Mikronukleus mitotisch in einen stationären und einen wandernden Kern. Letztere werden ausgetauscht und verschmelzen jeweils mit dem stationären Kern zu einem diploiden Synkaryon. Nach Trennung der Tiere teilt sich das Synkaryon mitotisch, und aus einem der Tochterkerne entwickelt sich, unter morphologischen und molekularen Veränderungen, ein neuer Makronukleus. Diesen heranwachsenden Makronukleus bezeichnet man als Makronukleusanlage (Ammermann, 1965). Bei der Entwicklung zu einem neuen Makronukleus treten bei hypotrichen Ciliaten (z. Bsp. Stylonychia, Oxytricha und Euplotes) polytäne Riesenchromosomen auf (Ammermann, 1965 und 1971), die im weiteren Verlauf bis zur Ausbildung des neuen Makronukleus wieder abgebaut werden. Während dieses Vorgangs werden über 90% des Mikronukleusgenoms eliminiert (Ammermann et al., 1974): 1. repetitive Sequenzen aus dem Mikronukleus, wie sie auch in eukaryotischer DNS vorkommen, gehen verloren; 2. die Komplexität wird auf das 11-fache von E. coli reduziert (Ammermann et al., 1974; Spear und Lauth, 1976; Steinbrück et al., 1981); 3. die DNS beziehungsweise das Chromatin wird im Makronukleus nicht chromosomal, sondern in sogenannten "gene-sized pieces" angelegt (Prescott et al., 1973; Lipps und Steinbrück, 1978; Elsevier et al., 1978). Die Größen der gengroßen Ma-DNS Moleküle liegen zwischen 0,45 und 21 kb (Lipps und Steinbrück, 1978) und tragen alle für die Regulation und Replikation notwendigen Sequenzen (Lawn et al., 1978; Lipps et al.,

1978).

Die Anzahl der Ma-DNS Stücke und damit Gene beträgt ca. 10 000 bis 15 000. Sie sind durchschnittlich je 15 000-fach vorhanden (Ammermann et al., 1974; Lipps et al., 1978; Nock, 1981), wobei einzelne Gene auch unterschiedlich oft vervielfacht sein können, wie neuere Untersuchungen gezeigt haben (Steinbrück, 1983).

An ihrem Ende besitzen diese Ma-DNS Stücke dieselbe "terminal inverted repeat sequence"

$$5' - C_4A_4C_4A_4C_4 \text{ --- } G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4 - 3'$$
$$3' - G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4 \text{ --- } C_4A_4C_4A_4C_4 - 5'$$

(Wesley, 1975; Oka et al., 1980; Klobutcher et al., 1981), deren Funktion allerdings noch völlig unbekannt ist. Die Ma-DNS ist mit den für Eukaryonten typischen Histonen assoziiert (Lipps et al., 1978) und ist im Chromatin in nucleosomaler Struktur angeordnet (Lipps und Morris, 1977). Weitere, möglicherweise höhere, strukturelle Anordnungen der gengroßen Ma-DNS Stücke und des Chromatins sind noch unbekannt. Jedoch nehmen Lipps et al. (1982) an, daß die gengroßen Ma-DNS Moleküle an ihren terminalen Sequenzen, durch Bindung von einem oder mehreren Proteinen, zusammengehalten werden könnten, wie Untersuchungen von Chromatin aus Makronuklei von Oxytricha nova im EM vermuten lassen.

Im Makronukleus, nicht aber im Mikronukleus, von Stylonychia konnte durch Bindung mit spezifischen Antikörpern (Lafer et al., 1981) die Existenz von Z-DNS nachgewiesen werden (Lipps et al., 1983). Diese Tatsache verdeutlicht einmal mehr die funktionellen Unterschiede zwischen Makro- und Mikronukleus, zumal der Z-DNS neben strukturellen auch regulatorische Funktionen zugeschrieben werden (Nordheim et al., 1982).

Der Kerndimorphismus, die gengroße Ma-DNS mit all

ihren dargelegten Besonderheiten, das Auftreten von polytänen Riesenchromosomen und nicht zuletzt die unterschiedliche Genaktivität der verschiedenen Kerne (Ammermann et al., 1974) bei den Stylonychia-Arten, welche zudem relativ einfach zu kultivieren sind, lassen diese Objekte hervorragend geeignet erscheinen, Genorganisation und Genregulation zu untersuchen.

Proteine sind als Regulatoren bei der Genaktivität sowie an der Bildung unterschiedlicher DNS-Strukturen maßgeblich beteiligt (Paul und Gilmour, 1975; Allfrey et al., 1975; Stein, 1976; Herrick und Alberts, 1976a und 1976b). Sie sind durch den Besitz von DNS-bindenden Eigenschaften besonders gekennzeichnet, was im wesentlichen mit der Struktur der Proteine zusammenhängt (Takeda et al., 1983). Die Spezifität wird auch dadurch bestimmt, wie groß und wie schnell die Fähigkeit eines Proteins ist, an eine bestimmte und nicht an eine beliebig andere DNS-Sequenz zu binden. Das Lac-Repressor-Protein beispielsweise bindet 10^7-fach stärker und 10^3-fach schneller an eine bestimmte als an eine beliebig andere DNS-Sequenz (Miller und Reznikoff, 1979; Riggs et al., 1970; Berg et al., 1982).

Im letzten Jahrzehnt sind einige DNS-bindende Proteine bei Prokaryonten und auch Eukaryonten, unter anderem bei Tetrahymena thermophila (Isao und Pearlman, 1981), identifiziert worden. Hierbei handelt es sich um Nichthistonproteine, die eine allgemein hohe Affinität zu DNS oder Chromatin besitzen. Die meisten davon binden unspezifisch und nur wenige sequenzspezifisch an die DNS. Zu ersteren gehören beispielsweise Einzelstrangbindende und Helix-destabilisierende Proteine (Coleman und Oakley, 1979) und Topoisomerasen (Wang, 1982; Gellert, 1981). Dazu gehören ebenso das RecA-Protein aus E. coli, das bei der Rekombination (Radding, 1981), und die Helicasen, die bei der Replikation eine wesentliche Rolle spielen.

Sequenzspezifische Proteine binden neben an einzelsträngige meist an doppelsträngige DNS und haben häufig genregulatorische Funktionen, wie zum Beispiel das Lac-Repressor-Protein (Müller-Hill, 1971), das T-Antigen (Tjian, 1981) und der 5S transcription factor (Engelke, 1980). Daß bis heute relativ wenige sequenzspezifische und genregulatorische Proteine identifiziert wurden, liegt vor allem daran, daß sie in nur äußerst geringen Konzentrationen in der Zelle vorkommen, und es deshalb schwierig ist, sie in ausreichender Menge zu isolieren.

Trotz dieser Schwierigkeiten war es das Ziel dieser Arbeit, DNS-bindende Proteine bei Stylonychia, vor allem der Ma-DNS, zu identifizieren. Dies bietet sich deshalb hier besonders an, da es möglich ist, DNS-Protein-Bindungen mit definierten DNS-Stücken in Form von einzelnen, kompletten Genen oder Genstücken, die relativ gut zu isolieren sind, durchzuführen. Da die terminale Sequenz ca. 3 - $5 \cdot 10^8$-fach im Makronukleus enthalten ist, müßte ein daran bindendes Protein in ähnlich großer Menge vorkommen, was eine gute Voraussetzung wäre, es identifizieren zu können. Dies gilt in gleicher Weise für andere Ma-DNS Sequenzen und daran bindende Proteine, da die Zahl der im Makronukleus vorliegenden Gene (10 000 - 15 000) relativ klein ist, und jedes dieser Gene, und damit auch spezifische DNS-Sequenzen, 15 000-fach vorhanden sind. Beispielsweise könnte dies für die Replikationsorigins und Promotorsequenzen zutreffend sein. Ein weiterer Punkt ist, daß inzwischen spezifisch Z-DNS-bindende Proteine bei Drosophila melanogaster gefunden worden sind (Nordheim et al., 1982), was darauf hindeutet, daß es im Makronukleus ebenfalls Proteine geben müßte, die selektiv an Z-DNS zu binden vermögen.

Die Suche nach solchen DNS-bindenden Proteinen erfolgte

durch Bindung von radioaktiv markierter DNS an die auf Nitrocellulosefilter immobilisierten Kernproteine (Bowen et al., 1980). Dazu bietet die Darstellung von DNS-Protein-Komplexen im Elektronenmikroskop eine weitere und ergänzende Möglichkeit, die DNS-Protein-Interaktionen zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsobjekt

Die in der vorliegenden Arbeit gemachten Untersuchungen wurden ausschließlich an dem Ciliaten Stylonychia lemnae (Ammermann und Schlegel, 1983; Steinbrück und Schlegel, 1983) aus der Familie Oxytrichidae der Ordnung Hypotricha durchgeführt.

2.1.1. Kulturbedingungen

Die Tiere wurden in Plastikpetrischalen (485 ml, Fa. Greiner) in Pringsheim (0,85 mM $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$, 0,35 mM KCl, 0,11 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$, 0,88 mM $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, pH 6,8) kultiviert und mit Chlorogonium elongatum täglich gefüttert (Ammermann et al., 1974). Auftretende Bakterienverunreinigungen wurden durch Zugabe von Penicillin (0,1 mg/ml Endkonzentration) beseitigt. Jeweils einen Tag vor Verwendung der Tiere wurde die Futtergabe abgesetzt, um eventuelle Einflüsse durch Chlorogoniumzellen auszuschließen.

2.2. Lösungen

1 x TE:

10 mM Tris
1 mM EDTA
pH 7,8

1 x Lysiermedium A (Ammermann et al., 1974):

0,05% Triton-X-100
100 mg Spermidinphosphat
ad 1000 ml H_2O

SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970):

2 ml 20% SDS
2 ml 87% Glycerin
1 ml 2-Mercaptoäthanol
1,25 ml 1 M Tris pH 6,8
0,2 ml 0,3% Bromphenolblau

Kavenoff-Zimm-Puffer (Kavenoff und Zimm, 1973):

10 mM Tris
0,5 mM EDTA
1% SDS
pH 9,5

Triton-Lysis-Mix (Clewell, 1969):

1 ml 10% Triton-X-100
25 ml 0,25 M EDTA
63 ml H_2O
pH 8

Laemmli-Puffer (Laemmli,1970):

1,92 M Glycin
0,25 M Tris
pH 8,3-8,4

10 x Kinase-Puffer (Maniatis et al., 1982):

0,5 M Iris pH 7,6
0,1 M $MgCl_2$
50 mM DTT
1 mM Spermidinphosphat
1 mM EDTA

10 x CIP-Puffer (Maniatis et al., 1982):

0,5 M Tris pH 9
10 mM $MgCl_2$
1 mM $ZnCl_2$
10 mM Spermidinphosphat

2 x Freezing-Medium (Schleif und Wensink, 1981):

12,6 g K_2HPO_4
0,9 g Na-Citrat
0,18 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
1,8 g $(NH_4)_2SO_4$
3,6 g KH_2PO_4
88 g Glycerol
H_2O ad 1000 ml

5 x Salz (Nick-Translation):

0,25 M Tris pH 7,8
25 mM $MgCl_2$
50 mM ß-Mercaptoäthanol
250 mg/ml BSA

Renaturierungspuffer, Proteine (Bowen et al., 1980):

4 M Harnstoff
50 mM NaCl
10 mM Tris
2 mM EDTA
0,1 mM DTT
pH 7

DNS-Probenpuffer:

1% SDS
0,1 mM EDTA
0,01% Bromphenolblau
50% Glycerin

10 x Proteinbindungspuffer (Bowen et al., 1980):

0,5 M NaCl
0,1 M Tris pH 7
10 mM EDTA
0,2% BSA
0,2% Ficoll
0,2% Polyvinylpyrollidon

20 x SSC (Denhardt, 1966):

3 M NaCl
0,3 M Na_3-Citrat
pH 7

10 x High salt buffer (Schleif und Wensink, 1981):

0,6 M NaCl
60 mM $MgCl_2$
60 mM Tris pH 7,5
10 mM DTT
500 µg/ml BSA

10 x EM-Bindungspuffer:

0,5 M NaCl
0,1 M Triäthanolamin-hydrochlorid pH 7
10 mM EDTA
10 mM DTT

10 x Denhardt's (Denhardt, 1966):

0,2% Ficoll
0,2% Polyvinylpyrollidon
0,2% BSA

2.3. Kernisolierungen

2.3.1. Isolierung von Makronuklei

Vegetative Tiere aus 30-40 Schalen wurden zuerst durch eine Polyamidgaze (Züricher Beuteltuchfabrik AG, Rüschlikon) mit einer Maschenweite von 60 µm von grösseren Verunreinigungen (Futterreste und Ausscheidungsprodukte) getrennt, mit einer 30 µm Gaze aufgefangen und in 1 x Lysiermedium A in einer Petrischale im Eisbad lysiert (Ammermann et al., 1974). Die Kerne wurden anschließend in einer Labofuge II (Heraeus Christ) 10 min bei 800 Upm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Kerne nochmals in 5-10 ml Lysiermedium A aufgenommen und über 1,4 M Sucrose in Lysiermedium A mit 3000 Upm (Labofuge III) für 10 min bei 4°C gereinigt. Die Kerne wurden in 1 x Lys A resuspendiert und unter dem Mikroskop Menge und Beschaffenheit (Karminessigsäurefärbung) kontrolliert. Danach wurden sie nochmals bei 800 Upm und 4°C pelletiert und wurden dann für Protein- bzw. DNS-Isolierung weiterverwendet.

2.3.2. Isolierung von Makronukleusanlagen

Um eine ausreichend große Menge von Ma-Anlagen isolieren zu können, wurden Tiere zweier unterschiedlicher Paarungstypen aus je 50 Schalen 1 : 1 vereint. Die Konjugation und Isolierung erfolgte dabei nach bereits beschriebener Methode (Ammermann et al., 1974). Durch Herstellen eines Quetschpräparates von Exkonjuganten kann im Phasenkontrastmikroskop überprüft werden, ob die Ma-Anlagen das richtige Stadium (voll ausgebildete Riesenchromosomen), das für eine Isolierung notwendig

ist, erreicht haben.

2.3.3. Isolierung von Mikronuklei

Vegetative Zellen aus ca. 100 Schalen wurden wie in 2.3.1. beschrieben lysiert und abzentrifugiert. Die Kerne (Makro- und Mikronuklei) wurden in 1 x Lysiermedium A aufgenommen und im Eisbad über eine Chrom-Nikkel-Gaze (Maschenweite 7 µm; EMI Electronics, Ltd., England) getrennt (Ammermann et al., 1974). Die Mikronuklei (Durchmesser ca. 5 µm) passieren, während die Makronuklei auf der Gaze zurückgehalten werden. Die Mikronuklei wurden bei 4°C mit 800 Upm für 10 min abzentrifugiert, in 1 x Lys A aufgenommen und unter dem Mikroskop auf ihre Reinheit kontrolliert. Bei Verunreinigungen mit Makronuklei wurde der v. g. Trennschritt über die Gaze wiederholt und die Kerne pelletiert.

2.3.4. Chromatinisolierung aus Makronuklei

Aus Tieren von 100 Schalen wurden die Makronuklei, wie in 2.3.1. beschrieben, isoliert. Nach dem Sucroseschritt wurden die Kerne je nach Größe des Pellets in 2-5 ml Puffer (10 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8) aufgenommen, für 10-15 min bei 0°C stehen gelassen und im Potter mit ca. 10-15 Stößen homogenisiert. Um sicher zu gehen, daß die Kerne lysiert waren, wurde ebenfalls eine mikroskopische Kontrolle (2.3.1.) durchgeführt. Diese Lösung wurde ca. 1 min bei 800-1000 Upm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand auf eine Sepharose 4B-Säule (Vol. ca. 50 cm^3), die mit Lösungspuffer (10 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8) äquilibriert war, gegeben (Lipps et al., 1982) und Fraktionen zu je 1 ml ab-

genommen. Nach der Bestimmung des OD_{260}-Wertes wurden die Chromatinfraktionen im Ausschlußvolumen vereinigt, 4-6 h bei 4°C gegen H_2O dialysiert und schließlich lyophilisiert.

2.4. Proteinaufarbeitung

2.4.1. Gesamtkernproteine

Jeweils nach dem letzten Zentrifugationsschritt der Makro-, Mikronuklei- und Ma-Anlagen-Isolierung (2.3.1.-2.3.3.) wurden die Kerne 2 x in 10 mM Tris pH 7 resuspendiert und 10 min bei 800-1000 Upm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde dann, bis auf ein dem Kernpellet entsprechendes Volumen, abgesaugt. Die Kerne wurden durch Zugabe von einem Volumen SDS-Probenpuffer lysiert, kurz und kräftig mit dem Vortex geschüttelt und 5-10 min gekocht. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben in der Eppendorfzentrifuge 5 min abzentrifugiert und der Überstand auf das Gel gegeben.

2.4.2. Proteine des Chromatins aus Makronuklei

Das Lyophilisat aus 2.3.4. wurde in 100-250 µl H_2O und SDS-Probenpuffer (1:1) aufgenommen und die Proteine durch Vortexen und 5 min Kochen gelöst. Nach Abzentrifugieren der Probe wurde der Überstand auf das Gel aufgetragen.

Sämtliche Proteinlösungen wurden bei -20°C aufbewahrt, ohne daß sich, auch nicht nach mehrmaligem Auftauen, nennenswerte Veränderungen durch Abbauerscheinungen im Bandenmuster zeigten. Vor dem Auftragen auf das Gel

war es jedoch nötig, die Proben aufzuschütteln, 5 min zu kochen und 5 min abzuzentrifugieren.

2.4.3. Proteinmengenbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach Lowry et al. (1951) mit Rinderserumalbumin als Standardwert durchgeführt. Die durchschnittlich isolierte Proteinmenge aus den Makronuklei betrug ca. 10-15 mg pro Ansatz.

2.4.3.1. Proteinmengenbestimmung in verdünnter Lösung

Diese Methode beruht im Prinzip auf dem Verfahren nach Lowry und wurde hier zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen gemacht, die aus Polyacrylamidgelen eluiert wurden. Die Versuchsbedingungen entsprachen dabei genau denen, wie sie von Schleif und Wensink (1981) bereits beschrieben wurden.

2.5. DNS-Isolierungen

2.5.1. DNS aus Makronuklei und Makronukleusanlagen

Die Isolierung der DNS erfolgte aus den nach 2.3.1. und 2.3.2. gewonnenen Kernen beziehungsweise Ma-Anlagen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet (Kerne/Anlagen) mit 1-2 ml 65°C warmem Kavenoff-Zimm-Puffer (Kavenoff und Zimm, 1973) aufgenommen und 10 min bei 65°C stehengelassen. Nun wurde Proteinase K (Stammlösung 10 mg/ml) bis zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugegeben und bei 50°C über Nacht inkubiert. Danach wurde 2 x mit Phenol/Chloroform (1:1)

und 1 x mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und jeweils 10 min bei 5 600 Upm abzentrifugiert. Die Reinigung der DNS erfolgte über eine CsCl-Gleichgewichtszentrifugation (Dichte 1,70-1,72 g/ml; Brechungsindex 1,3994-1,400) im Ti 50 Rotor für 24-36 h bei 43 000 Upm und 20°C. Der Gradient wurde zu Fraktionen von je 10 Tropfen abgelassen, der OD_{260}-Wert bestimmt, und nach Vereinigung der DNS-Fraktionen wurde über Nacht gegen 2 x 2 l 1 x TE dialysiert. Die Bestimmung der DNS-Konzentration wurde mit einem ZEISS Spektralphotometer PM 6 bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt und die DNS mit 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 4,5 und 2,5 Vol. 100% Äthanol bei -20°C über Nacht oder 10 min bei -70°C im Methanol-Trockeneisbad gefällt. Dann wurde die gefällte DNS 20-30 min bei 7 000 Upm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet (DNS) an der Luft getrocknet. Die DNS wurde in 1 x TE gelöst, so daß die Endkonzentration 1 mg/ml betrug, und die Qualität der DNS auf einem 1%igen Agarosegel getestet.

2.5.1.1. TCA-Fällung von DNS

Mit dieser Methode wurde radioaktiv markierte DNS von radioaktiv markierten Nukleotiden getrennt. Die Durchführung erfolgte nach den bei Schleif und Wensink (1981) beschriebenen Bedingungen. Nach dem Waschen der Filter mit Äthanol wurden sie bei Raumtemperatur unter Vakuum getrocknet und in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Unisolve I, Fa. Zinsser) gegeben und die eingebaute Aktivität im Flüssigkeitsszintillator (Packard Tricarb 3390) gemessen.

2.5.2. Plasmid-DNS - Isolierung

2.5.2.1. Großmengenisolierung (Cleared-Lysate Methode)

Die Plasmidisolierung wurde im wesentlichen nach Clewell (1969 und 1972) sowie Guerry et al. (1973) durchgeführt. Die Bakterien (E. coli HB 101) wurden in 1 l Minimalmedium M9 ohne NH_4Cl mit 0,4% Casaminoacids kultiviert (Clowes et al., 1968).

Zuerst wurde eine Übernachtkultur in 40 ml M9 mit Tetracyclin (15 µg/ml) angelegt. Diese Kultur wurde in 1 l M9 überimpft und die Bakterien in der log-Phase bei einem OD_{660}-Wert von 0,4, was nach ca. 4 h erreicht wird, durch Zugabe von 200 mg Chloramphenicol über Nacht amplifiziert. Danach wurden die Zellen in Nalgene-Bechern bei 7 000 Upm pelletiert und in 30 ml eiskaltem 1 x TE resuspendiert und nochmals pelletiert. Die Zellen wurden in 10 ml 25%-iger Sucrose in 50 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA aufgenommen und 2 ml Lysozym (5 mg/ml in 50 mM Tris pH 8) und 4 ml 0,25 M EDTA pH 8 zugegeben und für 5-10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 16 ml Triton-Lysis-Mix wurde vorsichtig geschüttelt (Lösung wird viskös) und für 15 min auf Eis gestellt. Diese Lösung wurde bei 10 000 Upm und 0°C für 80 min abzentrifugiert und das sogenannte Cleared Lysate (Überstand) mit 100 µg/ml RNase versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde 1 x mit Phenol/Chloroform (1:1) und 2 x mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und die DNS wie in 2.5.1. beschrieben gefällt und abzentrifugiert. Die DNS wurde nach kurzem Trocknen an der Luft in 15,8 ml 1 x TE gelöst und über einen CsCl-Gradienten gereinigt. Dazu wurden 16 g CsCl und 0,7 ml Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml) zugegeben, die Lösung in Polyallomer-Röhrchen gefüllt und im Ti 50 Rotor bei 43 000 Upm und

20°C für 36-48 h zentrifugiert (Beckman-Ultrazentrifuge). Unter UV-Licht wurde die untere Bande (supergecoilte Plasmid-DNS) mit einer Einmalspritze abgenommen und das Ethidiumbromid durch zweimaliges Ausschütteln mit Isoamylalkohol extrahiert. Die wässrige Phase (DNS) wurde 4-6 h gegen 2 x 2 l 1 x TE bei 4°C dialysiert und die Konzentration durch Messung des OD_{260}-Wertes bestimmt. Die Plasmid-DNS wurde gefällt, abzentrifugiert und in 1 x TE aufgenommen (vgl. 2.5.1.).

2.5.2.2. Schnellisolierung von Plasmid-DNS

Zur Größenbestimmung von klonierten Ma-DNS-Stücken und zu ersten Restriktionsanalysen wurden die Plasmide durch alkalische Lyse kleiner Mengen von Bakterienzellen isoliert. Dabei wurde genau nach der bei Birnboim und Doly (1979) beschriebenen Methode vorgegangen.

2.6. Gelelektrophoresen

2.6.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteinauftrennung erfolgte in einem linearen SDS-Polyacrylamidgradientengel von 7,5-15% (Laemmli, 1970; King und Laemmli, 1971). Das Flachgel hatte eine Grösse von 13 x 18 cm und eine Stärke von 1 mm. Der Gradient des Trenngels wurde durch einen Mixograph (Gilson) in 10 min bei einer Pumpengeschwindigkeit von 540 hergestellt. Die Sammelgelkonzentration betrug 5%. Je nach Konzentration der Proteinproben wurden zwischen 20 und 40 µl (ca. 50-100 µg) pro Laufspur aufgetragen. Die Laufzeit betrug bei konst. 70 V ungefähr 16 h, dabei wurde der 1:10 verdünnte Laemmli-Puffer mit 0,1%

SDS als Elektrophoresepuffer verwendet.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie-Brillant blue (1,25 g Coomassie-Brillant blue G 250 in 454 ml Methanol/H_2O <1:1> und 46 ml Eisessig) 1 h bei Zimmertemperatur gefärbt. Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung (30% Methanol, 10% Eisessig in H_2O) bei mehrmaligem Wechsel solange leicht geschüttelt, meist 1-2 h, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Das Gel wurde auf eine Lichtplatte gelegt und unter Verwendung eines Rotfilters fotografiert.

2.6.2. Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der DNS erfolgte je nach Art und Größe in Agarosegelen von 1-1,7% (Lipps und Steinbrück, 1978). Vor dem Auftragen auf das Gel wurde die DNS-Lösung 5:1 mit DNS-Probenpuffer versetzt und die Elektrophorese mit einem Tris-Acetat-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,8) durchgeführt. Die Laufzeit war abhängig von der Stärke und Konzentration der Gele und der angelegten, konstant gehaltenen Spannung. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die DNS mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

2.7. Transfer-Methoden

2.7.1. Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosefilter

Um DNS an die Proteine binden zu können, wurden die Proteine elektrophoretisch aus dem Gel auf Nitrocel-

lulose (BA 85, Schleicher & Schüll) übertragen. Dieses sogenannte "Western-Blotting"-Verfahren (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981) wurde dabei verändert nach Risau (pers. Mitteilung) verwendet.

Nach Beendigung der Proteinelektrophorese wurde das Gel in Renaturierungspuffer gelegt und 30 min bei Zimmertemperatur und zweimaligem Pufferwechsel leicht geschüttelt. Der Transfer wurde mit einer Art "Sandwich"-Konstruktion, die in Abb. 1 dargestellt ist, durchgeführt. Vor dem Aufeinanderlegen der einzelnen Schichten wurden sie mit Elektrophoresepuffer (Laemmli-Puffer 1:10 verdünnt) genässt. Beim Aufeinanderlegen der Schichten war unbedingt darauf zu achten, daß keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Die "Sandwich"-Konstruktion wurde in eine Elektrophoresekammer gestellt und die Kammer mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Eine Spannung von konst. 30 V (ca. 6 V/cm) wurde so angelegt, daß das Nitrocellulosefilter zur Anode hin lag und der Transfer bei 4°C 4 h dauerte. Nach Ende des Transfers wurden die Laufstrecken auf dem Filter gekennzeichnet und der Filter 10 min in 1 x Proteinbindungspuffer gespült. Anschließend wurden die Filter auf einer zuvor zerknitterten Alufolie bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet und staubfrei und trocken aufbewahrt.

2.7.1.1. Färbung von Proteinen auf Nitrocellulosefiltern

Nach dem Transfer oder erst nach den Bindungsversuchen wurden die Filter 15 min mit Amidoschwarz (1% Amidoschwarz in 43% Methanol und 10% Eisessig) gefärbt und mit 80% Methanol, 4% Eisessig unter mehrmaligem Wechseln für 45-60 min entfärbt. Die Filter wurden kurz in H_2O gespült, um ein Brechen der Filter nach dem Trock-

nen zu verhindern, da diese während der Färbeprozedur stark entwässert werden und dadurch auch etwas an Grösse verlieren. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur zwischen 3 MM - Whatmanpapier und Glasplatten wurden die Filter fotografiert und, eingeschweißt in Folie, aufbewahrt.

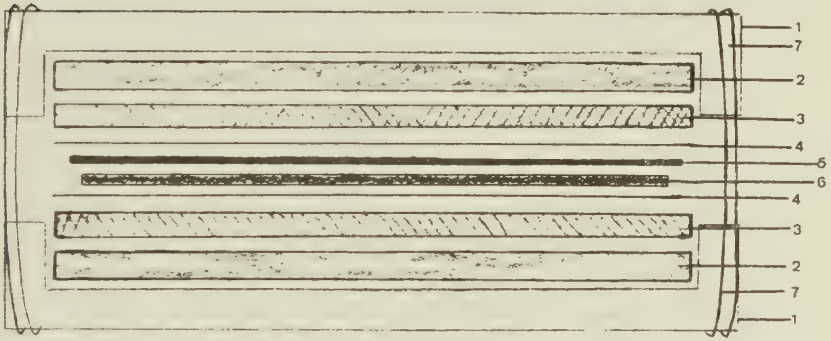

Abbildung 1: Sandwich-Konstruktion zum Protein-Blotting; (1) Plexiglas-Bügel zum Zusammenklemmen; (2) gelochte Kunststoffplatte; (3) saugfähiges Kunststoffgewebe (Scotch-Britt); (4) 3 MM - Whatmanpapier; (5) Polyacrylamidgel; (6) Nitrocellulosefilter; (7) Gummibänder.

2.7.2. Transfer von DNS auf Nitrocellulosefilter (Southern-Blot)

Der Transfer von DNS auf Nitrocellulosefilter (BA 85, Schleicher & Schüll) wurde im wesentlichen nach Southern (1975) durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde die DNS mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) gefärbt und fotografiert. Vor dem Transfer wurde das Gel 1 h in 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH gelegt und die DNS denatu-

riert (Maniatis et al., 1982) und das Gel anschließend 1 h in 1 M Tris pH 8 und 1,5 M NaCl neutralisiert. Der Transfer wurde mit 20 x SSC über Nacht durchgeführt und nach Beendigung wurden die Filter kurz in 2 x SSC gespült und 2 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

2.8. Radioaktive Markierung von DNS

2.8.1. Nick-Translation

Zur radioaktiven Markierung von DNS durch die sogenannte Nick-Translation wurde ausschließlich ^{32}P-α-dCTP verwendet und erfolgte im Wesentlichen nach der Methode von Rigby et al. (1977) und Maniatis et al. (1982). Ein Reaktionsansatz (50 µl) enthielt: Je 2 µl 0,1 mM dATP/dGTP/dTTP, 10 µl 5 x Salz, 1 µg DNS, 25 µCi ^{32}P-α-dCTP (spez. Aktivität 2 000-3 000 mCi/mmol; New England Nuclear), 2,5 µl DNase I (=0,02 µg/ml; Worthington), 12 U DNA-Polymerase I aus *E. coli* (BRL) und H_2O ad 50 µl. Dies wurde 60 min bei 15°C inkubiert und die Reaktion mit 10 µl 10% SDS gestoppt. Nach Zugabe von 40 µl Phenol (TE-gesättigt) wurde ausgeschüttelt, 5 min abzentrifugiert und der Überstand auf eine mit 1 x TE äquilibrierte Sephadex G 50 fine - Säule (Pasteurpipette) gegeben. Fraktionen zu je 150 µl wurden abgenommen und die eingebaute spezifische Aktivität im Ausschlußvolumen durch CERENKOV-Messung bestimmt. Sie betrug durchschnittlich $2\text{-}6 \cdot 10^7$ cpm/µg DNS.

2.8.2. 3' - Endmarkierung

Die DNS wurde nach Bollum (1974) und Tu et al. (1980) am 3'-Ende mit Cordycepin-5'-triphosphat (3'-deoxyadenosin-5-triphosphat; Amersham) durch Terminaldeoxynucleotidyltransferase markiert. Bei dieser Methode wird nur ein Nukleotid pro 3'-Ende angehängt, da dem Cordycepintriphosphat die Hydroxylgruppe an der 3'-Position fehlt. Die Reaktionsbedingungen waren: 50 µCi Cordycepin-5'-triphosphat (spez. Aktivität 2 000 Ci/mmol), 0,1 M K-Cacodylat pH 7, 1 mM $CoCl_2$, 0,1 mM DTT, 1 µg DNS und 10-15 U Terminale Transferase (Böhringer). Inkubiert wurde 30 min bei 37°C und die Reaktion mit 50 mM EDTA bei 0°C gestoppt. Mit 20 µg tRNS, 0,3 M Na-Acetat pH 5 und 2,5 Vol. Äthanol wurde die DNS bei -70°C (Methanol-Trockeneisbad) 10 min gefällt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,3 M Na-Acetat aufgenommen und nochmals gefällt. Dieser Schritt wurde solange, meist 3-4 mal, wiederholt, bis im Überstand nur noch eine geringe Aktivität vorhanden war. Danach wurde die DNS in 1 x TE gelöst und die eingebaute spezifische Aktivität durch CERENKOV-Messung bestimmt.

2.8.3.1. Dephosphorylierung von DNS

Um die 5'-Endmarkierung (2.8.3.2.) durchführen zu können, wurde die DNS mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP; Böhringer) am 5'-Ende dephosphoryliert (Chaconas und van de Sande, 1980). In einem Reaktionsvolumen von 50 µl wurde zu 1 µg DNS 1/10 Vol. 10 x CIP-Puffer, 2,5 U alkal. Phosphatase und H_2O ad 50 µl gegeben und für 15 min bei 37°C und weitere 15 min bei 56°C inkubiert. Dann wurden nochmals 2,5 U alkalische Phosphatase zugegeben und die Inkubation unter denselben Bedingungen wiederholt. Danach wurde zweimal mit Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform/

Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und die DNS mit Äthanol gefällt.

2.8.3.2. 5' - Endmarkierung

Die 5'-Endmarkierung mit T4-Polynucleotid-Kinase (Böhringer) wurde zur Markierung der kleinen DNS-Fragmente eingesetzt (Maxam und Gilbert, 1980). Ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50µl enthielt 0,1 µg dephosphorylierte DNS (2.8.3.1.), 1/10 Vol. 10 x Kinase-Puffer, 5 µl 0,1 M dATP, 50 µCi ^{32}P-γ-dATP (spez. Aktivität 3 000 Ci/mmol; New England Nuclear), 10-20 U T4-Polynucleotid-Kinase und H_2O ad 50 µl. Dies wurde 1 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Anschließend wurde die DNS mit 0,3 M Na-Acetat pH 5 und 2,5 Vol. Äthanol für 30 min bei -70°C (Methanol-Trockeneisbad) gefällt und 20 min bei 4°C abzentrifugiert. Die DNS (Pellet) wurde dann in 0,3 M NaAc gelöst und wieder gefällt. Dies wurde solange wiederholt, bis im Überstand keine nennenswerte Aktivität mehr vorhanden war. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde die DNS in 100 µl 1 x TE aufgenommen und ebenfalls die eingebaute Aktivität durch CERENKOV-Messung bestimmt.

2.9. DNS - DNS-Hybridisierungen

Die Nitrocellulosefilter mit der gebundenen DNS aus 2.7.2. wurden in 2 x SSC kurz gewässert und in Vorinkubationslösung (4 x SSC, 0,5% SDS, 5 x Denhardt's und 100 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNS) mit einem Volumen von ca. 250 µl/cm² Filter, eingeschweißt in Folie, für 4 h bei 65°C vorinkubiert. Die sich anschliessende Hybridisierung wurde mit ^{32}P-markierter DNS in

Vorinkubationsmedium 12-20 h bei 65°C durchgeführt. Die Hybridisierung wurde durch 2-4 h Waschen der Filter in 4 x SSC, 0,5% SDS bei 65°C beendet. Um Backgroundeffekte und unspezifische Bindungen zu verringern, wurde noch ein- bis zweimal mit 0,1-1 x SSC, 0,1% SDS bei gleicher Temperatur für 10-20 min gewaschen. Bei Hybridisierung mit den C_4A_4-Sequenz-Stücken (3.3.8.) wurde die Hybridisierung bei 40°C und sonst gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Das Waschen der Filter erfolgte bei 40°C mit denselben Waschlösungen. Nach dem Waschen wurden die Filter zwischen 3 MM-Whatman-Papier bei Raumtemperatur getrocknet, ein Röntgenfilm (Kodak-X-Omat S) aufgelegt und exponiert.

2.10. DNS - Protein - Bindungen

Die Bindung von radioaktiv markierter DNS an die auf Nitrocellulosefilter immobilisierten Proteine wurde im wesentlichen nach Bowen et al. (1980) durchgeführt. Dazu wurden die Filter in Streifen (Eine Laufspur der Proteinauftrennung im Gel) geschnitten und 20-30 min in 1 x Proteinbindungspuffer vorinkubiert und zur Durchführung der Bindungsreaktionen in Folien eingeschweißt. Die Bindung erfolgte mit radioaktiv markierter DNS (10^5 cpm/ml) in 1 x PbP (Inkubationsvolumen ca. 100 µl/cm² Filter) für 1 h unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur. Bei einigen Bindungsversuchen (s. Ergebnisse) wurden die Proteinfilter mit nicht markierter DNS (1 000-facher Überschuß zur eingesetzten radioaktiv markierten DNS) in 1 x PbP (Reaktionsvolumen ca. 200 µl/cm² Filter) bei Raumtemperatur für 1 h vorinkubiert (kompetiert). Hierfür wurden die Filterstreifen 2-3 min in 1 x PbP genäßt und nach der Vorinkubation 30 min in 1 x PbP mit mehrmaligem Pufferwechsel gewaschen und die Bindungsreaktion wie beschrieben durchgeführt.

Sowohl bei der Vorinkubation als auch bei der Bindungsreaktion war stets darauf zu achten, daß Luftblasen so weit wie möglich vermieden wurden und zumindest nicht auf die Filter zu liegen kamen. Für die Bindungen mit einzelsträngiger DNS wurde die DNS hitzedenaturiert (10 min Kochen und sofort danach auf Eis stellen) und wie beschrieben für die Bindungsreaktion eingesetzt. Nach Ende der Bindungsreaktion wurden die Filter in 1 x PbP 1-2 h intensiv gewaschen, wobei mehrmaliges Wechseln des Puffers, insbesondere zu Beginn der Waschprozedur, unbedingt erforderlich war, um Background und unspezifische Bindungen zu verringern. Dann wurden die Filter zwischen 3 MM-Whatman-Filterpapier und Glasplatten gelegt und unter Vakuum 20-30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak-X-Omat S) wurde bei -70°C exponiert und nach durchschnittlich 16 h entwickelt.

2.10.1. DNS - Protein-Bindungen bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen

Die Durchführung bei diesen Bindungen verlief genau nach der in 2.10. beschriebenen Methode. Verändert wurden nur die NaCl-Konzentrationen und zwar a) während der Bindungsreaktion und b) beim Waschen der Filter. Die NaCl-Konzentrationen betrugen dabei jeweils o,5 M, 1 M und 2 M.

2.11. Verdau von DNS mit Nukleasen

2.11.1. Nuklease Bal-31 - Verdau von Ma-DNS

Die terminalen inverted repeat Sequenzen (5'-C_4A_4)

(Wesley, 1975; Oka et al., 1980; Klobutcher et al., 1981) der "gene-sized" Ma-DNS Moleküle wurden durch den Verdau mit der Exonuklease Bal-31 entfernt. Die Reaktionsbedingungen wurden so gewählt, daß ca. 10 bp/min wegverdaut wurden (Maniatis et al., 1982) und waren wie folgt: 600 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 12 mM $MgCl_2$, 12 mM $CaCl_2$, 0,1 U Enzym/µg DNS und 1 µg DNS pro 5 µl Reaktionsvolumen. Inkubiert wurde 30 min bei 30°C und die Reaktion durch Zugabe von 100 mM EDTA bei 0°C gestoppt. Dann wurde die DNS je einmal mit Phenol und Chloroform und zweimal mit Äther ausgeschüttelt, 2-4 h gegen 1 x TE dialysiert und gefällt.

2.11.2. Nuklease S1 - Verdau von Ma-DNS

Durch den Verdau von Ma-DNS mit S1-Nuklease wurde das überstehende 3'-G_4T_4-Stück der terminalen inverted repeat Sequenzen entfernt. Dabei wurde mit folgenden Reaktionsbedingungen, in Anlehnung an Maniatis et al. (1982), gearbeitet: 300 mM NaCl, 10 mM NaAc pH 5, 2,5 mM $ZnSO_4$, 0,05 U Enzym/µg DNS und 1 µg DNS auf 5 µl Reaktionsvolumen. Dies wurde 15-20 min bei 37°C inkubiert und der Verdau mit 50 mM EDTA bei 0°C gestoppt. Danach wurde wie in 2.11.1. mit Phenol, Chloroform und Äther extrahiert und die DNS gefällt.

2.11.3. Verdau mit Restriktionsendonukleasen

2.11.3.1. Pst I

Der Verdau mit Pst I wurde vor allem zur Linearisierung des Plasmids pBR 322 (für die Klonierung von Ma-DNS; s. 2.14.) und die Reisolierung von eingebauten

Ma-DNS - Stücken aus den Plasmiden verwendet. Der Verdau wurde bei Bedingungen von 1/10 Vol. "High salt buffer", 2 U Enzym/µg DNS und 1 µg DNS pro µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Inkubiert wurde dabei 2-16 h bei 37°C. Nach Ende des Verdaus wurde die DNS entweder mit Phenol/Chloroform ausgeschüttelt und gefällt oder nach Zugabe von DNS-Probenpuffer sofort auf dem Gel aufgetrennt.

2.11.3.2. Hind III, Bam HI und Bgl I

Die klonierten Ma-DNS - Stücke wurden durch Verdau mit den Restriktionsenzymen Hind III, Bam HI und Bgl I analysiert. Die Bedingungen für die Verdaue entsprachen dabei denen, wie sie bereits für den Verdau mit Pst I beschrieben wurden.

2.11.3.3. Eco RI

Die äußeren Reaktionsbedingungen für den Verdau mit Eco RI entsprachen ebenfalls denen des Pst I - Verdaus. Nur der Inkubationspuffer von 60 mM NaCl, 6 mM $MgCl_2$, 150 mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT und 50 µg/ml BSA (Schleif und Wensink, 1981) war geringfügig verschieden.

2.11.3.4. Sal I

Der Verdau mit Sal I wurde in gleicher Weise wie der Pst I - Verdau, nur mit ebenfalls leicht unterschiedlicher Pufferzusammensetzung von 200 mM NaCl, 6 mM $MgCl_2$, 6 mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT und 50 µg/ml BSA (Schleif und Wensink, 1981), durchgeführt.

2.11.3.5. Alu I und Hae III

Um ein 61 bp großes DNS-Fragment mit der terminalen C_4A_4-Sequenz aus Oxytricha nova aus dem Plasmid des Klons pOH 7 zu isolieren (vgl. 3.3.8.), wurde nach den bei Boswell et al. (1982) beschriebenen Bedingungen vorgegangen. Dazu wurde das Plasmid zuerst mit Alu I und ein dabei erhaltenes 135 bp großes DNS-Stück mit Hae III verdaut, wobei die Reaktionsbedingungen für beide Verdaue mit denen des Pst I - Verdaus (2.11.3.1.) identisch waren.

2.12. DNS-Bandenisolierung aus LOW-MELTING Agarosegelen

Nach der Auftrennung der DNS in einem Low-melting Agarosegel (BRL) wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und die betreffende DNS-Bande ausgeschnitten. Das Gelstückchen wurde in einem verschraubbaren Zentrifugenröhrchen in ein 65°C warmes Wasserbad gestellt und zum Schmelzen gebracht. Dazu wurden 2 Vol. Eluierungspuffer (50 mM Tris pH 8, 0,5 mM EDTA) 65°C warm zugegeben, für 5 min in ein Wasserbad mit 37°C gebracht und mit gleichem Volumen 37°C warmem Phenol (gesättigt mit 10 mM Tris) ausgeschüttelt und abzentrifugiert. Die Agarose bildet so eine unlösliche Interphaseschicht. Der Überstand wurde nochmals mit Phenol ausgeschüttelt und abzentrifugiert. War die Interphaseschicht sehr dick, so wurde sie nach Zugabe von 1 Volumen Eluierungspuffer nochmals ausgeschüttelt und abzentrifugiert. Restliches Phenol im Überstand wurde durch zweimaliges Ausschütteln mit Äther extrahiert. Danach wurde die wässrige Phase 2-4 h gegen 1 x TE dialysiert und die DNS gefällt.

2.13. Protein-Bandenisolierung aus SDS-Polyacrylamidgelen

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde eine Spur abgeschnitten und mit Coomassie-Brillant blue gefärbt (s. 2.6.1.). Das ungefärbte Gel, auf einer Glasplatte liegend, wurde mit dieser in Haushaltsfolie verpackt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach dem Entfärben des Gelstreifens wurde er kurz in H_2O dest. gespült, da er bei der Färbeprozedur entwässert und deshalb kleiner wird. Der Gelstreifen wurde dann neben das in Folie verpackte Gel gelegt und die Lage der zu eluierenden Banden auf der Folie markiert und ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden mit einem Skalpell zerkleinert und in einem verschließbaren Reagenzglas mit ca. 2 Vol. Proteinrenaturierungspuffer über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde die Proteinlösung durch siliconisierte Glaswatte (SERVA) zentrifugiert, um sie von Gelpartikeln zu reinigen, und 4 h gegen 2 x 1 l 10 mM Tris pH 7, 1 mM EDTA und 1 mM DTT bei 4°C dialysiert.Die Proteine wurden mit 0,4 N H_2SO_4 und 9 Vol. Aceton bei -20°C über Nacht gefällt und 30 min bei 10 000 Upm und 1°C pelletiert.Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zwei- bis dreimal mit Aceton gewaschen und in 0,5 ml 1 x EM-Bindungspuffer gelöst. Um noch vorhandene H_2SO_4 zu entfernen, wurde noch einmal 2 h gegen 1 x EM-Bindungspuffer dialysiert. Die so erhaltenen Proteine wurden für die Bindungsversuche zur Beobachtung von DNS-Protein-Komplexen im Elektronenmikroskop verwendet und die restlichen Proteinlösungen mit 50% Glycerol bei -20°C aufbewahrt.

2.14. Klonierung von Ma-DNS - Stücken in pBR 322

Die Ma-DNS - Stücke wurden durch sogenanntes G-/C-Tailing (Addition von Nukleotiden an das 3'-Ende) in die einzige Pst I-Site, die im Ampicillinresistenzgen liegt, in pBR 322 eingebaut. Diese Methode bietet den Vorteil, daß durch dieses G-/C-Tailing je eine Pst I-Schnittstelle an den Enden des Inserts neu gebildet wird, und damit die Möglichkeit besteht, das Insert durch einen Pst I - Verdau wieder einfach und vor allem in voller Größe aus dem Plasmid isolieren zu können.

2.14.1. G-Tailing von pBR 322

Das Plasmid wurde zuerst durch einen Pst I - Verdau linearisiert (2.11.3.1.) und zweimal über Low-melting Agarosegele gereinigt und eluiert (2.12.). Letzteres ist unbedingt erforderlich, da supergecoiltes Plasmid eine 10-fach höhere Transformationsrate besitzt als ringförmiges rekombinantes Plasmid.

Das Tailen am 3'-Ende mit dGTP wurde in Anlehnung an Roychoudhury et al. (1976), Rowekamp und Firtel (1980) und Schleif und Wensink (1981) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen waren dabei folgendermaßen: 30 µCi getrocknetes ^{3}H-dGTP (spez. Aktivität 11,7 Ci/mmol; Amersham), 0,05 mM dGTP, 0,1 M K-Cacodylat pH 7, 1 mM $CoCl_2$, 0,1 mM DTT und 4 µg pBR 322 in 100 µl Reaktionsvolumen. Dies wurde 2 min bei 37°C vorinkubiert, dann wurden 60 U Terminale Transferase zugegeben und bei 37°C weiterinkubiert. Nach 5, 10 und 20 min wurden Aliquots von je 5 µl abgenommen und mit TCA gefällt (2.5.1.1.), um die Zahl der anhängenden dGs über die gemessene Radioaktivität zu bestimmen. Die Tailing Reaktion wurde dazu jeweils nach Abnahme eines Aliquots

im Eisbad gestoppt und nach Bestimmung der eingebauten Nukleotide bei 37°C weiterinkubiert. Nach 20 min waren ca. 20 dGs anpolymerisiert, und die Reaktion wurde mit 50 mM EDTA bei 0°C gestoppt. Anschließend wurde mit Phenol, Chloroform und Äther ausgeschüttelt und die DNS gefällt.

2.14.2. C-Tailing von Ma-DNS - Genstücken

Die Ma-DNS Genstücke konnten ohne vorherigen Restriktionsenzym-Verdau am 3'-Ende mit dCTP getailt werden. Die Reaktionsbedingungen entsprachen dabei denen, wie sie für das G-Tailing von pBR 322 (2.14.1.) beschrieben wurden. Verschieden davon waren nur die spezifische Aktivität von ^{3}H-dCTP mit 18,2 Ci/mmol und die eingesetzte Menge von nur 12 U Terminaler Transferase. Außerdem konnte die Reaktion (20 angehängte Nukleotide pro Ende) schon nach 10 min gestoppt werden.

2.14.3. Reannealing

0,1 µg poly(dG) getailtes pBR 322 und eine äquimolare Menge, ebenfalls 0,1 µg, an poly(dC) getailter Ma-DNS wurden in 100 µl 0,1 M NaCl, 0,1 M Tris pH 7,5 und 0,2 mM EDTA renaturiert. Die Reaktion wurde durchgeführt, indem in einem Wasserbad zuerst 2 min bei 62°C, dann 2 h bei 42°C inkubiert und durch Ausschalten des Wasserbades über Nacht langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wurde.

2.14.4. Transformation von pBR 322 in E. coli

Die Transformation der renaturierten Plasmid-DNS (2.14.3.) in E. coli HB 101[1)] basierte im Wesentlichen auf Mandel und Higa (1970) und auf Schleif und Wensink (1981).

Die Bakterien wurden in 40 ml LB (Luria-Bertani)-broth (10 g Bactotrypton, 5 g NaCl, 5 g Yeastextrakt auf 1 l) über Nacht angezogen und 1:100 in LB-broth in einem 250 ml-Erlenmayerkolben verdünnt und bei 37°C weiter hochgezogen. Noch in der log-Phase, nach Erreichen des OD_{660}-Wertes von 0,6 (meist nach 3 h), wurden die Zellen 5 min abzentrifugiert, das Pellet in 20 ml eiskaltem 50 mM $CaCl_2$ aufgenommen und 20-30 min im Eis stehen gelassen. Die Zellen wurden erneut pelletiert, in 2 ml eiskaltem 50 mM $CaCl_2$ resuspendiert und über Nacht bei 0°C inkubiert. 0,1 ml dieser Zellsuspension wurden zu 0,1 ml (= 0,1 µg) reannealter Plasmid-DNS gegeben, leicht geschüttelt und 10-20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion bei 37°C Hitze geschockt, für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, mit 1 ml 37°C warmem LB-broth versetzt und nochmals für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 2,5 ml LB-broth wurden die Zellen auf LB-Agarplatten (15 g Agar auf 1 l LB-broth) mit Tetracyclin (15 µg/ml) in Verdünnungen von 1:10, 1:100, 1:500 und 1:1000 ausplattiert. Nach 1-2 Tagen wurden die gewachsenen Kolonien auf ihre Ampicillinresistenz getestet und die Tetracyclin-resistenten Klone (ca. 10 000) in LB-Freezingmedium 1:1 in Mikrotiterplatten angelegt und bei -70°C aufbewahrt.

[1)] Der Bakterienstamm wurde freundlicherweise von Dr. K.G.Handke vom mikrobiologischen Institut der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

2.15. Elektronenmikroskopische Darstellung von DNS-Protein-Komplexen

Zur Darstellung von DNA-Protein-Komplexen im Elektronenmikroskop wurde eine proteinfreie Spreitungsmethode (Davis und Hyman, 1970) in abgeänderter Form verwendet. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: In einem Reaktionsvolumen von 75 µl wurde die DNS (100 µg/ml) mit ca. 0,5 µg Protein in 50 µl aus 2.13. in 1 x EM-Bindungspuffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der DNS-Protein-Komplex wurde nun durch Zugabe von Glutaraldehyd bis zu einer Endkonzentration von 0,1% für 10 min bei 37°C fixiert. Als Kontrolle wurde die Bindungsreaktion auch mit BSA durchgeführt. Nach der Fixierung wurde die DNS-Protein-Komplex-Lösung mit 1 x EM-Bindungspuffer 1:500 verdünnt, ein Tropfen (35 µl) dieser Lösung auf Parafilm gegeben und für 10 min unter einer Petrischale belassen. Dann wurde ein mit Parlodion beschichtetes Cu-Netzchen (300 mesh) mit der Schichtseite für 5-10 min auf die Tropfenoberfläche gelegt. Nach Abnahme des Netzchens wurde es kurz in 95%-igen Äthanol gespült, auf Filterpapier abgetupft und zum Trocknen ausgelegt. Danach wurden die Netzchen mit Platin bedampft[1)] und im Elektronenmikroskop (ZEISS-EM 9) ausgewertet.

[1)] Für die Bedampfung der Netzchen und hilfreiche Unterstützung bei der Arbeit am Elektronenmikroskop danke ich Herrn Schoppmann von der elektronenmikroskopischen Abteilung der Zoologie der Universität Tübingen.

3. Ergebnisse

3.1. Proteinisolierungen

Die Proteine der unterschiedlichen Kernpräparationen zeigen nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgradientengel und Färbung mit Coomassie-Brillant blue ein konstantes und reproduzierbares Bandenmuster von 30-40 Banden unterschiedlichen Molekulargewichts. Dabei ist die unterschiedlich starke Färbung der Banden ein Maß für die isolierte Proteinmenge.

Es war jedoch wichtig, darauf zu achten, daß die Tiere bei der Isolierung möglichst frei von Chlorogonium-Zellen waren und daß bei den einzelnen Isolierungsschritten stets bei 0°C - 4°C gearbeitet wurde, um eventuelle Abbauprozesse so gering wie möglich zu halten. Außerdem mußte bei der Isolierung von AnlP die Kontamination mit Makronuklei äußerst gering gehalten werden, wobei gleiches auch für die Isolierung von MiP galt. Dahingegen fielen die Mikronuklei bei der Isolierung von MaP nicht ins Gewicht. Die gute Reproduzierbarkeit der Proteinbandenmuster ließ deshalb darauf schließen, daß keine oder nur minimale Verunreinigungen durch cytoplasmatische oder andere Kern-Proteine enthalten sein konnten.

Als Molekulargewichtsmarker dienten Kalbsthymus-Histone und Proteingemische (in kd): Insulin 3; Rinder-Trypsin-Inhibitor 6,2; Cytochrom C 12,3; Lysozym 14,3; ß-Lactoglobulin 18,4; α-Chymotrypsinogen 25,7 und Ovalbumin 43 kd (BRL), sowie Lysozym 14,3; ß-Lactoglobulin 18,4; Trypsinogen 24; Pepsin 34,7; Ovalbumin 45 und BSA 66 kd (Sigma).

3.1.1. Makronukleusproteine

Das MaP-Bandenmuster von Stylonychia lemnae (Abb. 2a) ist dem Bandenmuster der MaP aus Oxytricha nova (Lipps et al., 1982) nicht unähnlich. Es ist gekennzeichnet durch zwei stärker gefärbte Doppelbanden mit Molekulargewichten von 50 bzw. 40 kd (→ 2,3). Nur sehr schwach ausgebildet sind die hochmolekularen Proteinbanden >50 kd, mit Ausnahme einer weiteren Doppelbande von etwa 80 kd, die etwas deutlicher zu erkennen ist (→ 1). Weiter findet man eine starke einzelne Bande mit einem Molekulargewicht von 30 kd (→ 4). Daran schließt sich ein Block aus ca. 5 Proteinen mit Molekulargewichten um 25 kd (→ 5) an. Im niedermolekularen Bereich sind die in großer Menge vorkommenden Core-Histone (H2A, H2B, H3, H4) deutlich zu erkennen.

3.1.2. Proteine von isoliertem Chromatin aus Makronuklei

Das Chromatin aus Makronuklei, das über Sepharose 4B mit niedrigen Salzbedingungen isoliert wurde, enthält eine viel geringere Zahl an Proteinen als der gesamte Makronukleus (Abb. 2b). Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß die Ribonuklein- und Kernsaftproteine fehlen und der überwiegend größte Teil von DNS-assoziierten Proteinen stammt. So findet man, neben den ebenfalls in großer Menge vorhandenen Core-Histonen, nur ca. 10-12 Nichthistonproteine, wobei hochmolekulare Proteinbanden >50 kd fast gänzlich fehlen. Identisch mit den MaP sind neben anderen die beiden Doppelbanden bei 50 und 40 kd (→ 1,2) und die Bande mit 30 kd (→ 3). Von dem bei den MaP aus 5 Proteinen bestehenden Block mit 25 kd findet man hier nur noch 3 Proteine (→ 4).

3.1.3. Makronukleusanlagenproteine

Das Proteinbandenmuster aus Ma-Anlagen, in denen die Riesenchromosomen voll ausgebildet sind, zeigt deutliche Unterschiede gegenüber dem MaP-Bandenmuster (Abb. 2c). Auffallend ist eine sehr prominente Doppelbande im höher molekularen Bereich mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kd (→ 1), die in den MaP überhaupt nicht vorhanden ist. Andererseits fehlt den AnlP ein 80 kd großes Protein, das man in den MaP findet. Ebenso wie bei den MaP erscheint eine Doppelbande mit 50 kd, wobei die untere Bande deutlich schwächer ist als im MaP-Bandenmuster, wo beide Banden gleich stark auftreten. Anstatt der Doppelbande bei 40 kd des MaP-Bandenmusters ist im AnlP-Bandenmuster nur eine einzelne Bande zu sehen (→ 2). Mit 35 kd findet man ein Protein, das im MaP-Bandenmuster völlig verschwunden ist, und gerade umgekehrt verhält es sich mit einem Protein von etwa 30 kd (→ 3). Einen weiteren großen Unterschied bildet eine Doppelbande bei 28 kd (→ 4), welche in den MaP ebenfalls nicht gefunden wird. Von da an bis hin zu einem Molekulargewicht von 19 kd sind in den Anl keine Proteine dieser Größe enthalten, wohingegen im Ma etwa 6 Proteine in diesem Molekulargewichtsbereich vorkommen. Ein 19 kd-Protein (→ 5), knapp oberhalb der Core-Histone laufend, ist wiederum im MaP-Bandenmuster nicht oder nur sehr schwach zu sehen. Den überwiegend größten Anteil der AnlP bilden die Core-Histone, wie es auch bei den MaP der Fall ist.

3.1.4. Mikronukleusproteine

Auch die MiP ergeben ein spezifisches Bandenmuster (Abb. 2d), das sich deutlich von den Bandenmustern der MaP und der AnlP unterscheidet. Ein wesentlicher Unterschied besteht in zwei hochmolekularen, stark angefärbten Proteinbanden mit Molekulargewichten von etwa 180 bzw. 150 kd (→ 1,2), die weder in den MaP noch in den AnlP zu finden sind. Außerdem treten zwischen diesen und einer Doppelbande mit 50 kd, die auch im MaP- und AnlP-Bandenmuster vorkommt, keine Banden auf. Ebenso findet man keine Proteine mit Molekulargewichten zwischen 40 und 28 kd. Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß die Core-Histone, bezogen auf die Nichthistonproteine, in geringerer Menge vorkommen als bei den MaP und AnlP. Ähnlich dem MaP-Bandenmuster erscheint eine Doppelbande bei 40 kd, bei der jedoch die obere Bande auf gleicher Höhe mit der unteren Bande aus den MaP läuft (→ 3). Der gleiche Block aus 5 Proteinen um 25 kd ist, wie bei den MaP, auch bei den MiP vorhanden. Und in Übereinstimmung mit dem AnlP-Bandenmuster tritt eine Doppelbande mit einem Molekulargewicht von 28 kd auf (→ 4). Weitere zwei Banden mit etwa 20 kd sind weder in den AnlP noch in den MaP enthalten (→ 5).

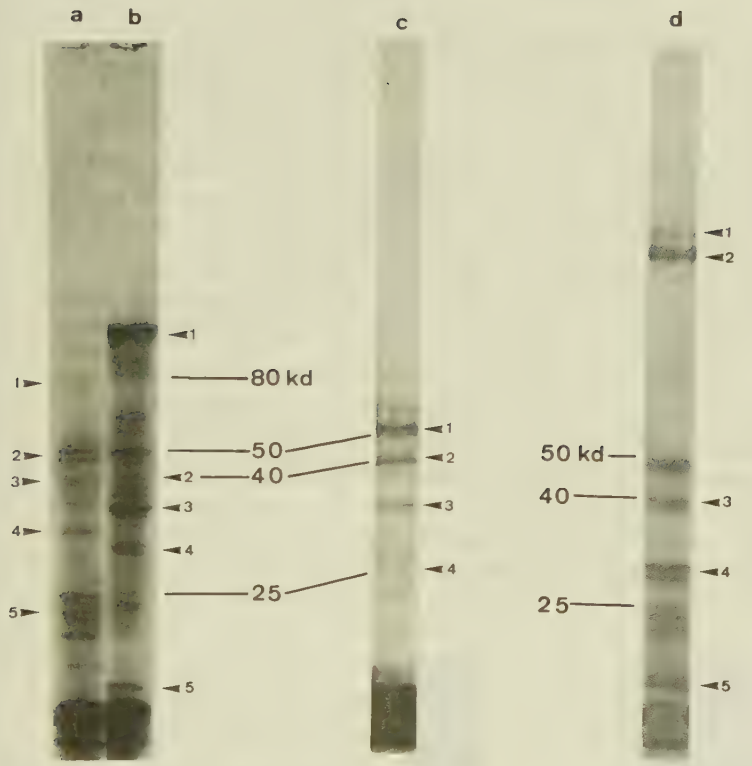

Abbildung 2: Vergleich der Proteine aus den verschiedenen Kernen von Stylonychia lemnae, aufgetrennt auf einem SDS-Polyacrylamidgradientengel (7,5-15%), Färbung mit Coomassie-Brillant blue (2.6.1.);
(a) Makronukleusproteine (MaP),
(b) Makronukleusanlagenproteine (AnlP),
(c) chromosomale Proteine aus Makronuklei nach Reinigung des Chromatins über Sepharose 4B (2.3.4.),
(d) Mikronukleusproteine (MIP).

3.2. Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosefilter (Western-Blotting)

Die durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine (3.1.) wurden für die Bindungsreaktionen elektrophoretisch, dem sogenannten "Western-Blotting", auf Nitrocellulosefilter transferiert (2.7.1.). Die Abb. 3 zeigt Gele vor (a) und nach (b) dem Transfer, sowie die Färbung eines Nitrocellulosefilters (2.7.1.1.) nach dem Transfer (c). Die Transferrate ist abhängig von der Größe der Proteine und liegt durchschnittlich bei etwa 75%. Das Muster auf dem Filter ist mit dem des Gels identisch, nur die Banden erscheinen etwas breiter. Die Färbung der Filter mit Amidoschwarz wurde zur genaueren Identifikation von Banden nach der Bindung von DNS mit den Proteinen herangezogen, um falsche Interpretationen zu vermeiden und um die Qualität des Transfers zu testen. Der Vorteil dieser Methode liegt in der kurzen Dauer und in der Effektivität des Transfers.

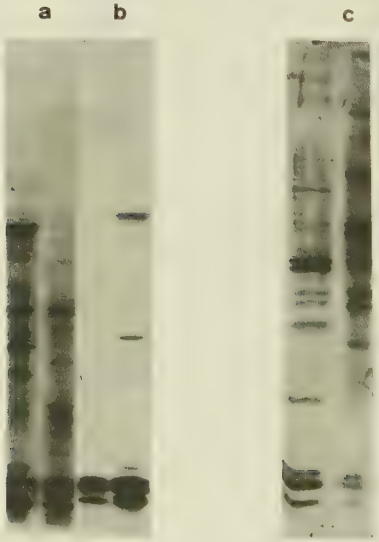

Abbildung 3: Elektrophoretischer Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosefilter (2.7.1.). MaP und AnIP nach Färbung mit Coomassie-Brillant blue
(a) vor und
(b) nach dem Transfer;
(c) dieselben MaP und AnIP nach dem Transfer auf Nitrocellulosefilter und Färbung mit Amidoschwarz (2.7.1.1.).

3.3. DNS - Protein - Bindungsversuche

Auf der Suche nach DNS-bindenden Proteinen wurde so vorgegangen, daß ^{32}P-markierte DNS an die auf Nitrocellulosefilter immobilisierten Proteine (2.7.1.; Abb. 3c) gebunden wurde.

In einigen Experimenten wurden die Proteinfilter vor der eigentlichen Bindungsreaktion mit nicht markierter DNS in 1 000-fachem Überschuß kompetiert (vorinkubiert), um unspezifische Bindungen zu unterdrücken. Zur Kompetition wurden, je nach Versuch, verschiedene DNS-Sorten benutzt.

3.3.1. Bindung von Gesamt-Ma-DNS an Makronukleus- und Makronukleusanlagen-Proteine

Da es das Ziel war, nach DNS-bindenden Proteinen bei Stylonychia zu suchen, lag es nahe, zuerst das Bandenmuster der Bindung von Gesamt-Ma-DNS an die MaP zu ermitteln. Die Bindungsreaktion mit ^{32}P-markierter Gesamt-Ma-DNS erfolgte dabei direkt, ohne daß die Filter vorher mit unmarkierter DNS kompetiert wurden. Die Autoradiographie, dargestellt in Abb. 4a, zeigt, daß die Ma-DNS an alle MaP bindet und das autoradiographische Bandenmuster dem mit Coomassie-Brillant blue gefärbten MaP-Bandenmuster entspricht.

In 3.1.3. wurde festgestellt, daß die Proteinbandenmuster aus den Makronuklei und den Ma-Anlagen sehr unterschiedlich sind. Da außerdem der DNS-Gehalt und die Zusammensetzung des Genoms (repetitive Sequenzen und Komplexität) in Ma-Anlagen anders ist als im Makronukleus (Ammermann et al., 1974), könnte man annehmen, daß die Ma-DNS nicht an alle AnlP bindet. Das Bandenmuster der Bindung von Gesamt-Ma-DNS an die AnlP ist in Abb. 4b dargestellt und zeigt, daß die Ma-DNS auch an alle AnlP bindet, entsprechend dem Muster der mit

Coomassie-Brillant blue gefärbten AnlP.

Ebenso verhält es sich bei der Bindung von Gesamt-Ma-DNS an die Chromatinproteine aus dem Makronukleus (nicht dargestellt), bei der die Ma-DNS auch an alle Proteine bindet.

3.3.2. Bindung von Ma-Anlagen-DNS an Makronukleus- und Ma-Anlagen-Proteine

Ob sich das Ergebnis der Bindungen mit der Gesamt-Ma-DNS (3.3.1.) auch für die Anl-DNS bestätigt, sollte durch die Bindungen von Anl-DNS an die MaP und die AnlP überprüft werden. Die Bandenmuster der Bindungen von Anl-DNS an die MaP und die AnlP (nicht dargestellt) sind absolut identisch mit denen der Bindungen mit Gesamt-Ma-DNS (Abb. 4a+b). Die Anl-DNS bindet also wie die Ma-DNS, auch mit der gleichen Intensität, an alle Proteine aus dem Makronukleus und den Ma-Anlagen.

3.3.3. Bindung von Kalbsthymus- und E. coli-DNS an Makronukleus- und Ma-Anlagen-Proteine

Die in 3.3.1. und 3.3.2. gemachten Untersuchungen legen nahe, daß DNS ganz generell eine hohe Affinität für Bindungen mit Kernproteinen besitzt (Takeda et al., 1983; Berg et al., 1982). Deshalb wurden Bindungen an die MaP und AnlP auch mit KT- und E. coli-DNS durchgeführt, die unter Standardbedingungen (2.10.), aber ohne Kompetition, erfolgten. Die Bindungen an die MaP und AnlP ergeben dieselben Bandenmuster wie die Bindungsversuche mit Gesamt-Ma-DNS (Abb. 4a+b) und mit Anl-DNS, was in Abb. 4c-f zu sehen ist.

Die autoradiographischen Bandenmuster der v.g. Bindungsversuche zeigen außerdem, daß die Intensität der Banden der Proteinmenge pro Bande proportional zu sein scheint, was bedeutet: Je größer die Proteinmenge in einer Bande ist, desto stärker ist die Intensität einer Bande nach der Bindung. Oder anders ausgedrückt: Je größer die Proteinmenge, desto mehr DNS wird gebunden.

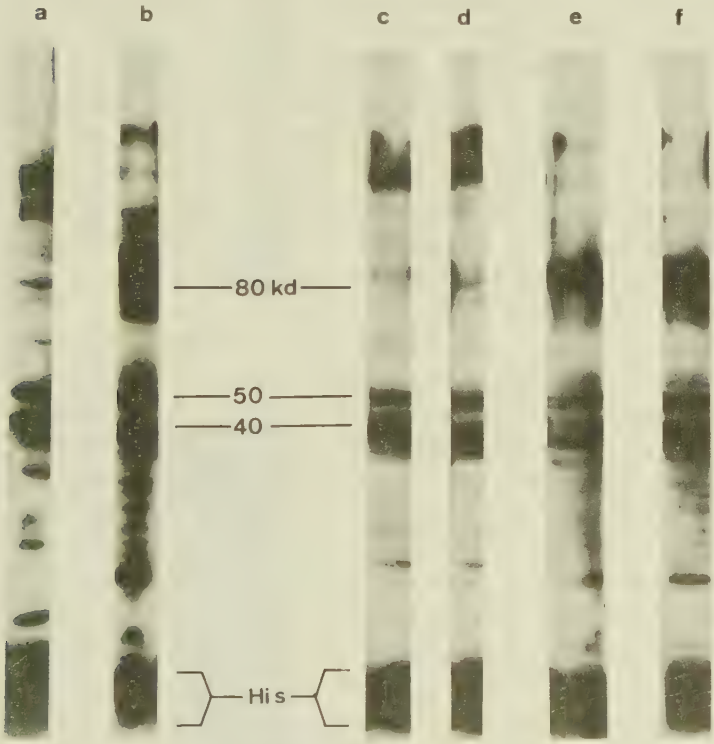

Abbildung 4: DNS-Proteinbindungen auf Nitrocellulosefiltern;
MaP und AniP aufgetrennt in SDS-Polyacrylamidgradientengelen 7,5-15% (2.6.1.), transferiert auf Nitrocellulosefilter (2.7.1.), Bindung mit ^{32}P-markierter DNS (2.10.);
Bindung von Gesamt-Ma-DNS an MaP (a) und an AniP (b);
Bindung von KT-DNS an MaP (c) und an AniP (e);
Bindung von *E. coli*-DNS an MaP (d) und an AniP (f).

3.3.4. Bindung von Gesamt-Ma-DNS an Makronukleusproteine bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen

Die Bildung einer DNS-Protein-Interaktion ist im Wesentlichen abhängig von der Proteinstruktur (Anderson et al., 1981; Takeda et al., 1983). Ein Parameter dafür und für regulatorische Funktionen kann die Zusammensetzung des Reaktionsmilieus, beispielsweise Veränderungen des pH-Wertes, von Salz- und Ionenkonzentration sein, wodurch die Struktur von Molekülen und/oder ihre Funktion beeinflußt werden kann.

Hier nun sollte untersucht werden, wie stabil die Bindung einzelner Proteine an die DNS bei höheren Salzkonzentrationen ist. So wurde in den folgenden Versuchen Gesamt-Ma-DNS ohne vorherige Kompetition und unter normalen Salzbedingungen (50 mM NaCl) an MaP gebunden und die Filter nach den Bindungsreaktionen mit 0,5 M, 1 M und 2 M NaCl in 1 x PbP ca. 60 min gewaschen. Die Autoradiographien dieser Bindungsversuche sind in Abb. 5 dargestellt und zeigen, daß die Intensität der Banden sehr stark abnimmt und einige Banden völlig verschwinden, wobei der größte Verlust an Banden und Bindungsintensität bereits nach dem Waschen der Filter in 0,5 M NaCl eintritt. Der Verlust an Radioaktivität auf den Filtern konnte auch schon während der Waschprozedur durch Messung mit einem Helium-ß-Zählrohr festgestellt werden. Spur (a) zeigt das Bandenmuster nach dem Waschen in 50 mM, (b) in 0,5 M, (c) in 1 M und (d) in 2 M NaCl-Konzentration.

In einem weiteren Versuch, Gesamt-Ma-DNS an MaP zu binden, wurden nun die Bindungsreaktionen selbst in höheren Salzbedingungen (0,5 M, 1 M und 2 M NaCl) durchgeführt und die Filter anschließend in normalen Salzbedingungen (50 mM NaCl) gewaschen. Das Ergebnis

Abbildung 5:

DNS-Protein-Bindung in unterschiedlichen Salzkonzentrationen; MaP aufgetrennt in SDS-Polyacrylamidgradientengel (7,5-15%); transferiert auf Nitrocellulosefilter und Bindung mit Gesamt-Ma-DNS;
Filter mit (a) 0,5 M NaCl,
(b) 1 M NaCl und
(c) 2 M NaCl
in 1 x PbP 1 h gewaschen.

Abbildung 6B:

Schnittstellen für Hind III (▼)
in kloniertem Ma-DNS-Stück mit 1,7 kb
(vgl. Text 3.3.5.);
□ = terminale C_4A_4 - Sequenz.

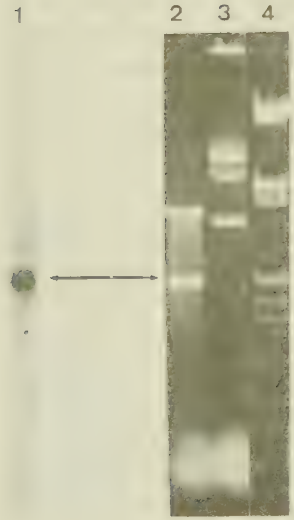

Abbildung 6A:

Kloniertes Ma-DNS-Stück ($1/B_2$) im Plasmid reisoliert (2.5.2.) Spur 3;
mit Hind III geschnitten (2.11.3.2.) Spur 2;
in 1,5% Agarosegel, Ethidiumbromid-gefärbt, Molekulargewichtsmarker-DNS Hind III/Eco RI-verdaut (Spur 4);
Southern-Transfer auf Nitrocellulose,
Hybridisierung mit C_4A_4 - Sequenz-Stück
(s. Text 3.3.5. und 3.3.8.) Spur 1.

(nicht dargestellt): Es kamen überhaupt keine Bindungen zustande; im autoradiographischen Bild waren keine Banden zu sehen.

3.3.5. Bindung von Ma-Genstücken an Makronukleusproteine

Die Bindungen mit Gesamt-Ma-, Anl-, KT- und E. coli-DNS (3.3.1.-3.3.3.) zeigen, daß unter den gegebenen Bedingungen die DNS wahrscheinlich nur auf Grund von Ladungsunterschieden zwischen DNS und Proteinen (Berg et al., 1982) an alle Kernproteine bindet, und daß dies mit der Größe und Komplexität der DNS zusammenzuhängen scheint. Um daher eher Unterschiede bei den DNS-Protein-Bindungen zu bekommen, wurden Bindungen mit definierten Ma-DNS-Stücken (Gene und Genstücke) an MaP durchgeführt.

Um Gene oder Genstücke für die Bindungsversuche einsetzen zu können, wurde Gesamt-Ma-DNS mit pBR 322 als Vektor in E. coli kloniert (2.14.), die eingebauten DNS-Stücke reisoliert (2.5.2./2.11.3.1.) und mit den Restriktionsenzymen Hind III, Bam HI, Eco RI, Sal I und Bgl I (2.11.3.) charakterisiert (Abb.6B). Durch Southern-Hybridisierung von klonierten Ma-DNS-Stücken auf Gesamt-Ma-DNS (2.9.) konnte festgestellt werden, ob die klonierten Ma-DNS-Stücke volle Gengröße hatten oder nicht (nicht dargestellt). Die Hybridisierung von 3'-endmarkierter C_4A_4-Sequenz auf das mit einem Restriktionsenzym (hier: Hind III) geschnittene Ma-DNS-Stück zeigte (Abb. 6A, Spur 1), ob das DNS-Stück die terminalen inverted repeat Sequenzen an beiden Enden trägt. Damit können die Inserts ebenfalls auf volle Gengröße überprüft werden. Für das zu den Bindungsversuchen ausgewählte Ma-DNS-Stück können die Ergebnisse v.g. Untersuchungen folgendermaßen zusammengefaßt wer-

den: 1) Das Insert besitzt nicht die volle Gengröße und ist 1,7 kb groß; 2) Es hat die terminale Sequenz nur an einem Ende; 3) Es besitzt 2 Schnittstellen für Hind III mit Fragmenten von 1,2 kb, das die terminale Sequenz enthält, von 0,3 kb und von 0,2 kb; 4) Es hat keine Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Pst I, Eco RI, Bam HI, Bgl I und Sal I.

Für die Bindung an die MaP wurden das 1,7 kb-Genstück und die Hind III-Fragmente aus Low-melting Agarosegelen eluiert (2.12.) und ^{32}P-markiert, wobei die grossen Fragmente "Nick"-translatiert und die kleinen 5'-endmarkiert wurden (2.8.3.2.).

Zuerst wurde das 1,7 kb große Genstück unter Standardbedingungen (2.10.) ohne vorherige Kompetition der Filter an MaP gebunden. Das Ergebnis (Abb. 7a) zeigt, obwohl die hochmolekularen Banden nicht gut zu erkennen sind, dasselbe Muster wie die Bindung mit Gesamt-Ma-DNS (3.3.1.; Abb. 4a).

Da auch hier keine spezifische DNS-Protein-Bindung zu erkennen ist, und um möglicherweise Hinweise für eine spezifischere Bindung zu bekommen, wurde mit dem 1,2 kb großen Hind III-Fragment ohne vorherige Kompetition an die MaP gebunden. Das Resultat (hier nicht dargestellt): Man erhält wieder das gleiche Bandenmuster wie mit dem 1,7 kb-Stück und der Gesamt-Ma-DNS.

Da die 1,7- und 1,2 kb-Fragmente immer noch zu hohen unspezifischen Bindungen führen, wurden schließlich Bindungsversuche mit den kleinen, 0,3 kb und 0,2 kb großen Hind III-Fragmenten durchgeführt. Sie wurden wie die DNS-Stücke zuvor an die MaP gebunden, ohne daß vorher die Filter kompetiert wurden. Die Bandenmuster aus diesen Bindungsversuchen sind in Abb. 7b+c zu sehen. Sie zeigen eine deutliche Bande bei 50 kd neben den ebenfalls deutlichen Banden der Histone. Andere wenige und nur sehr schwach ausgebildete Banden sind

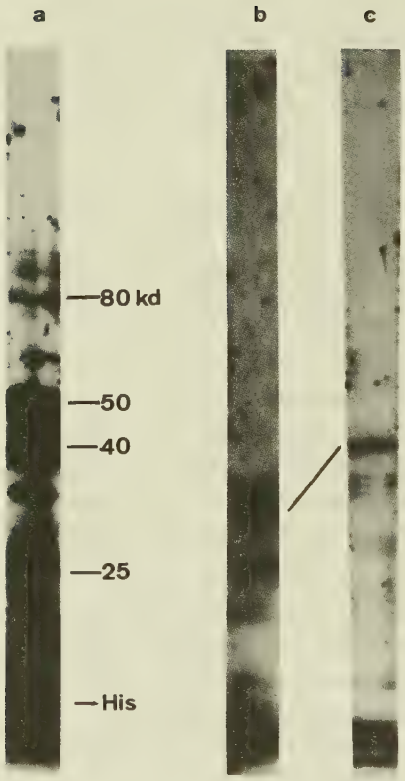

Abbildung 7:

Bindung von Ma-DNS Genstücken an MaP; MaP aufgetrennt in SDS-Polyacrylamidgel (7,5-15%), Transfer auf Nitrocellulose, Bindung mit ^{32}P-markierten Ma-DNS-Stücken:
(a) 1,7 kb Hind III-Fragment,
(b) 0,3 kb Hind III-Fragment,
(c) 0,2 kb Hind III-Fragment
(s. Abb. 6B).

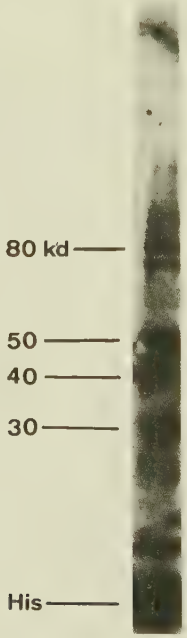

Abbildung 8: Bindung von Z-DNS an MaP; MaP aufgetrennt in SDS-Polyacrylamidgel (7,5-15%), Transfer auf Nitrocellulose, Bindung mit 3'-endmarkierter Z-DNS.

zwischen der 50 kd- und den Histon-Banden zu erkennen. Keine Banden findet man im Molekulargewichtsbereich über 50 kd.

3.3.6. Bindung von Z-DNS an Makronukleusproteine

Lipps et al. (1983) konnten nachweisen, daß die DNS im Makronukleus von Stylonychia mytilus in vivo neben der B- auch in Z-Form (Wang et al., 1979) vorkommt. Inzwischen gelang es Nordheim et al. (1982), Z-DNS-bindende Proteine bei Drosophila melanogaster zu identifizieren. Nun sollte untersucht werden, ob Z-DNS-bindende Proteine auch im Makronukleus enthalten sind. Die Z-DNS (poly dG-dC)[1)] wurde am 3'-Ende mit ^{32}P markiert (2.8.2.) und die Bindungsreaktion nach Standardbedingungen (2.9.2.) durchgeführt. Das Ergebnis, dargestellt in Abb. 8, zeigt, daß die Z-DNS an fast alle Proteine bindet. Obwohl keine Bande besonders stark hervortritt, wie man dies bei einer spezifischen Bindung vielleicht erwarten würde, scheint die Intensität der Bindung mit dem 30 kd-Protein (→ 1) in Bezug zur 50 kd- und 40 kd-Bande (→ 2+3) stärker zu sein, als dies bei Bindung mit Gesamt-Ma-DNS der Fall ist. Trotz dieser Beobachtung und dem Fehlen von Banden im Bereich von 25 kd (→ 4) können keine eindeutigen Aussagen für ein spezifisch Z-DNS-bindendes Protein gemacht werden.

[1)] Die Z-DNS wurde freundlicherweise von Dr. A. Rich, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA, zur Verfügung gestellt.

3.3.7. Bindungen mit Bal-31 - verdauter Ma-DNS an Makronukleusproteine

Ausgangspunkt für die Bindungsversuche mit $Ma\text{-}DNS_{Bal\text{-}31}$ war, daß alle "gene-sized" Ma-DNS-Moleküle die gleichen terminalen inverted repeat Sequenzen (Wesley, 1975; Oka et al., 1980; Klobutcher et al., 1981) besitzen, und daß es, wie angenommen wird (Lipps et al., 1982; Gottschling, pers. Mitteilung), Proteine gibt, die spezifisch an diese terminale Sequenz binden. Geht man weiter davon aus, daß im Makronukleus etwa 10^4 verschiedene Genstücke enthalten sind, und jedes $1{,}5 \cdot 10^4$-fach vorhanden ist (Lipps et al., 1978), so bedeutet dies, daß die terminale Sequenz ca. $3\text{-}5 \cdot 10^8$-fach im Makronukleus vorliegt. Daraus ist weiter zu schließen, daß die an die terminale Sequenz bindenden Proteine in größerer Menge vorkommen und nach Färbung des Gels als deutliche Bande zu sehen sein müßten. Dies würde auf die Proteine mit Molekulargewichten von 50 kd, 40 kd, 30 kd und 25 kd zutreffen (Abb. 2a). Demzufolge müßte man nach Bindung mit Gesamt-Ma-DNS auch eine starke Bande im autoradiographischen Muster finden können (Abb. 4). Da aber wegen ihrer hohen Affinität die DNS an alle Kernproteine bindet, wie die Untersuchungen mit Gesamt-, Ma-, Anl-, KT- und E. coli-DNS (3.3.1.-3.) zeigen, konnte diese spezifische Bande nicht lokalisiert werden. Nun dürfte andererseits nach Bindung mit Ma-DNS ohne diese terminalen Sequenzen diese Bande nicht im autoradiographischen Muster auftreten.

Um aber unspezifische Bindungen durch die hohe Affinität der DNS so gering wie möglich zu halten, erschien es notwendig, die Filter vor der Bindungsreaktion zu kompetieren. Die Überlegung war, daß nach Kompetition mit nicht markierter Gesamt-Ma-DNS und Bindung mit $Ma\text{-}DNS_{Bal\text{-}31}$ eine Bande, die aus der Bindung

mit der terminalen Sequenz herrührt, nicht mehr erscheinen dürfte, im Gegensatz zur Bindung mit Gesamt-Ma-DNS nach Kompetition mit nicht markierter Ma-DNS$_{Bal-31}$, bei der diese Bande deutlich zu sehen sein müßte.

Davon ausgehend wurden nun die terminalen Sequenzen von der Ma-DNS durch den Verdau mit der Exonuklease Bal-31 entfernt. (2.11.1.; Abb. 9). Die Bedingungen waren so, daß etwa 500 bp pro Ende wegverdaut wurden. Diese DNS wurde dann zur Kompetition oder markiert (2.8.1.) bei den Bindungsversuchen eingesetzt.

Die Abb. 10 zeigt die autoradiographischen Muster nach Bindung mit Gesamt-Ma-DNS und vorangehender Kompetition mit Ma-DNS$_{Bal-31}$ (a) und nach Bindung mit Ma-DNS$_{Bal-31}$ und vorangehender Kompetition mit Gesamt-Ma-DNS (b). Es fällt auf, daß bei (a) eine Doppelbande mit ca. 80 kd auftritt, die bei (b) völlig fehlt. Die noch weiter auftretenden Banden beider Bindungsversuche sind zwar identisch, jedoch ist die Intensität der Banden bei 50 kd und bei 40 kd in (b) schwächer als in (a). Es ist anzunehmen, daß diese Doppelbande bei 80 kd durch spezifische Bindung von DNS-Sequenzen zustande kommen muß, die durch den Verdau mit Bal-31 entfernt worden sind. Ob es sich dabei um die terminalen Sequenzen handelt, was durch dieses Resultat impliziert wird, kann jedoch mit diesem Versuch nicht geklärt werden.

Um herauszufinden, ob es sich hier tatsächlich um eine spezifische Bindung von Stylonychia-DNS handelt, wurde mit beschallter Lachssperma-DNS kompetiert und mit Gesamt-Ma-DNS gebunden. Das Ergebnis, dargestellt in Abb. 10c, zeigt dieselbe 80 kd-Doppelbande wie die Abb. 10a.

Die folgenden Bindungsversuche, deren Bandenmuster in Abb. 11a-c dargestellt sind, wurden zur weiteren Be-

Abbildung 9: Bal-31 - Verdau von Ma-DNS (2.11.1.);
(1) Ma-DNS unverdaut,
(2) Ma-DNS Bal-31 - verdaut.

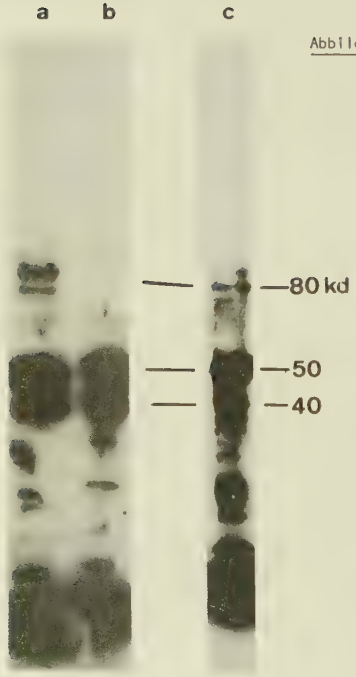

Abbildung 10: DNS-Bindung an MaP; MaP aufgetrennt in SDS-Polyacrylamidgel (7,5-15%), Transfer auf Nitrocellulose;
(a) Proteinfilter mit nicht markierter $Ma\text{-}DNS_{Bal-31}$ kompetiert, Bindung mit ^{32}P-markierter Gesamt-Ma-DNS;
(b) Proteinfilter mit nicht markierter Gesamt-Ma-DNS kompetiert, Bindung mit ^{32}P- markierter $Ma\text{-}DNS_{Bal-31}$;
(c) Proteinfilter mit nicht markierter Lachssperma-DNS (beschallt) kompetiert, Bindung mit ^{32}P-markierter Gesamt-Ma-DNS;
Waschen der Filter in 1 x PbP (a-c).

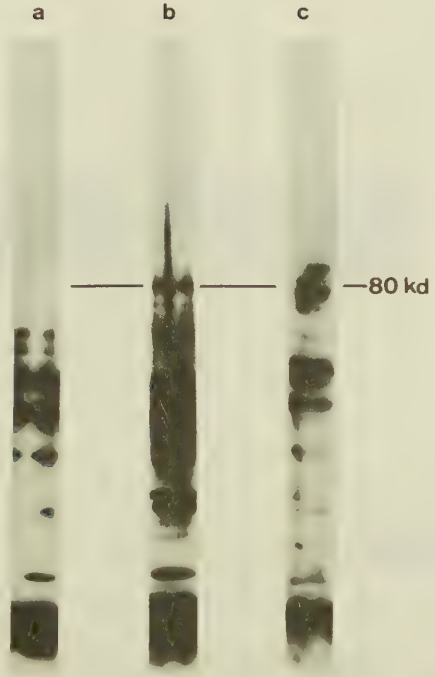

Abbildung 11: DNS-Bindung an MaP; MaP in SDS-Polyacrylamidgel (7,5-15%) aufgetrennt, Transfer auf Nitrocellulose;
(a) Filter mit nicht markierter Ma-DNS$_{Bal-31}$ kompetiert, Bindung mit ^{32}P-markierter SS-Ma-DNS$_{Bal-31}$;
(b) Filter mit SS-Ma-DNS$_{Bal-31}$ kompetiert, Bindung mit Gesamt-Ma-DNS;
(c) Filter mit Ma-DNS kompetiert, Bindung

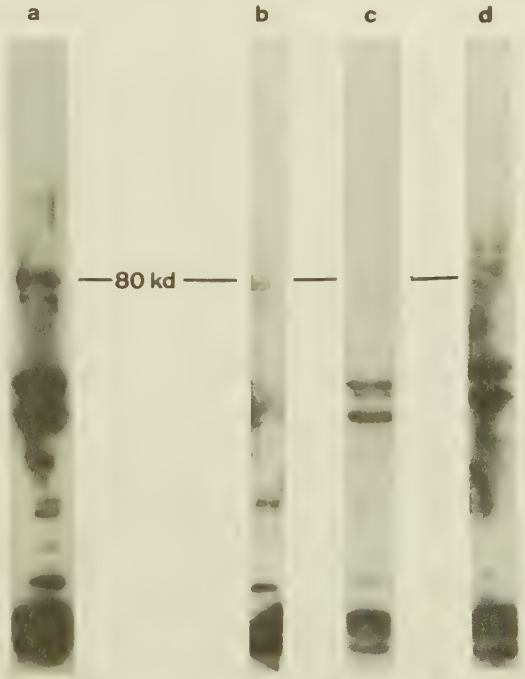

Abbildung 12: DNS-Bindung an MaP bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen; MaP in SDS-Polyacrylamidgel (7,5-15%) aufgetrennt, Transfer auf Nitrocellulose, Proteinfilter mit nicht markierter Ma-DNS$_{Bal-31}$ kompetiert, Bindung mit ^{32}P-markierter Gesamt-Ma-DNS, Filter in 1 x PbP mit (a) 50 mM, (b) 0,5 M, (c) 1 M, und (d) 2 M NaCl gewaschen.

stätigung und zur Klärung der Frage, ob es sich bei der Bindung der 80 kd-Doppelbande um eine Einzel- oder Doppelstrangbindung handelt, durchgeführt. In (a) ist das autoradiographische Muster nach Kompetition des Filters mit Ma-DNS_{Bal-31} und anschließender Bindung mit markierter SS-Ma-DNS_{Bal-31} zu sehen. Wie zu erwarten, findet man keine Bindung bei einem Molekulargewicht von 80 kd. Die Abb. 11b zeigt die Bindung mit Gesamt-Ma-DNS nach vorausgehender Kompetition des Proteinfilters mit SS-Ma-DNS_{Bal-31}, bei der die Bande bei 80 kd wieder zu sehen ist, wie in Abb. 10a. Und bei Abb. 11c schließlich wurde der Proteinfilter mit Ma-DNS_{Bal-31} kompetiert und die Bindung mit SS-Gesamt-Ma-DNS durchgeführt. Auch hier erhält man wieder die Bande bei 80 kd, wie bei 10a.

3.3.7.1. Bindungsversuche zu 3.3.7. mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen

Auch hier wurde untersucht, bei welchen Salzbedingungen eine Bindung an das 80 kd-Protein noch eingegangen wird, um vielleicht einen Hinweis auf eine mögliche Funktion dieses Proteins zu erhalten. In 3.3.4. wurde schon gezeigt, daß eine hohe Salzkonzentration während der Bindungsreaktion zu keiner DNS-Protein-Bindung führt. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Bindungsintensität nach dem Waschen der Filter in höheren Salzkonzentrationen sehr stark zurückgeht.

Dies gilt auch für die Bindung mit dem 80 kd großen Protein, deren Stabilität schon nach dem Waschen des Filters in 0,5 M NaCl völlig verschwindet und nach dem Waschen in 1 M und 2 M NaCl auch nicht stabil bleibt. Die Bandenmuster in Abb. 12a-d geben die Bindung mit

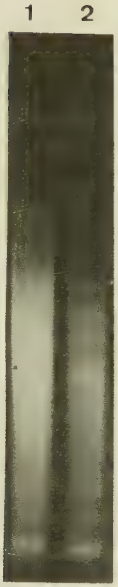

Abbildung 13:
S1-Verdau von Ma-DNS (2.11.2.)
in 1% Agarosegel;
(1) Ma-DNS unverdaut,
(2) Ma-DNS S1-verdaut.

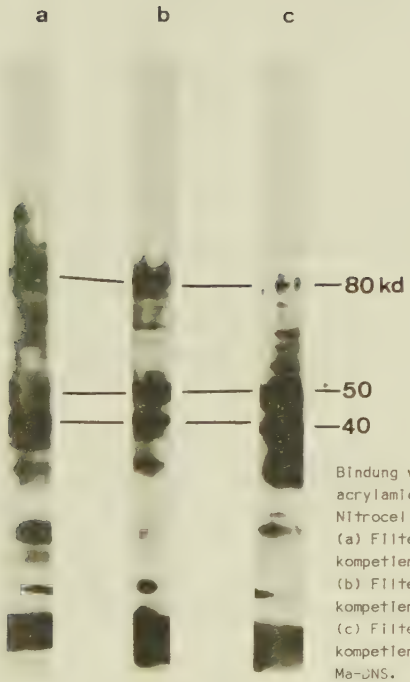

Abbildung 14:
Bindung von S1-Ma-DNS an MaP; MaP in SDS-Polyacrylamidgel (7,5-15%) aufgetrennt, Transfer auf Nitrocellulose;
(a) Filter mit nicht markierter Gesamt-Ma-DNS kompetiert, Bindung mit ^{32}P-markierter S1-Ma-DNS;
(b) Filter mit nicht markierter Ma-DNS$_{Bal-31}$ kompetiert, Bindung mit ^{32}P-markierter S1-Ma-DNS;
(c) Filter mit nicht markierter SS-Gesamt-Ma-DNS kompetiert, Bindung mit ^{32}P-markierter Gesamt-Ma-DNS.

markierter Gesamt-Ma-DNS nach Kompetition mit Ma-DNS$_{Bal-31}$ wieder. Spur (a) zeigt das Bandenmuster nach dem Waschen in normalen Salzbedingungen (50 mM NaCl), (b) nach dem Waschen in 0,5 M, (c) in 1 M und (d) in 2 M NaCl jeweils in 1 x PbP.

3.3.7.2. Bindungsversuche zu 3.3.7. mit Nuklease S1-verdauter Ma-DNS

Falls es sich, wie der Versuch in 3.3.7. andeutet, um das terminale Sequenz-bindende Protein handelt, so sollte durch Bindung mit S1-verdauter Ma-DNS (2.11.2.; Abb. 13), von der das überstehende 3'-G_4T_4-Stück entfernt wurde, untersucht werden, ob die Bindung nur an diesem überstehenden Stück oder an der gesamten terminalen Sequenz stattfindet.

Dazu wurde zum einen der Proteinfilter mit Gesamt-Ma-DNS kompetiert und dann mit markierter S1-Ma-DNS gebunden (Abb. 14a). Zum anderen wurde mit $Ma\text{-}DNS_{Bal\text{-}31}$ kompetiert und dann die Bindung mit S1-Ma-DNS durchgeführt (Abb. 14b). Und zum dritten wurde mit Gesamt-Ma-DNS gebunden, nachdem der Filter mit SS-S1-Ma-DNS kompetiert worden war (Abb. 14c).

Die Ergebnisse dieser Bindungsversuche mit der S1-Ma-DNS lassen keine eindeutigen Aussagen über den genauen Bindungsort zu, wie aus den Bandenmustern in Abb. 14 hervorgeht. Da bei allen drei Bindungsversuchen eine Bindung mit dem 80 kd-Protein erfolgt, müßte die Bindung an der gesamten terminalen Sequenz stattfinden.

3.3.7.3. Bindungen zu 3.3.7. mit Ma-Genstücken aus 3.3.5.

Die Bindungen mit den Ma-Genstücken aus 3.3.5. wurden auch nach Kompetition der Filter mit Gesamt-Ma-DNS bzw. $Ma\text{-}DNS_{Bal\text{-}31}$ durchgeführt, um zeigen zu können, daß die 80 kd-Bande tatsächlich durch Bindung einer bestimmten Sequenz entsteht.

Die Bindung mit dem 1,2 kb Hind III-Fragment, das die terminale Sequenz enthält, ergab nach Kompetition des Filters mit Ma-DNS$_{Bal-31}$ das Bandenmuster, das in Abb. 15a dargestellt ist. Auch hier erhält man die Bande bei 80 kd (→ 1). Interessant bei diesem Bindungsversuch ist außerdem, daß die Bande bei 40 kd, im Vergleich zu der bei 50 kd, sehr deutlich ausgebildet ist (→ 2).

Wenn es sich bei der 80 kd-Bande um eine spezifische Bindung mit vom Ende der Ma-Genstücke stammenden Sequenzen handelt, so dürfte man bei Bindung mit den kleinen Hind III-Fragmenten von 0,3 und 0,2 kb nach Kompetition mit Ma-DNS$_{Bal-31}$ keine Bande mit 80 kd erhalten. Das Bandenmuster dieser Versuche, hier nicht dargestellt, entsprach aber dem Bandenmuster der Abb. 15b+c, die die Bindung mit den 0,3 (b) und 0,2 (c) kd großen Fragmenten nach Kompetition der Filter mit Gesamt-Ma-DNS zeigen. Man erkennt neben den Histonbanden nur eine Bande bei 50 kd und keine Bindung bei 80 kd, wie dies auch schon die Bindungen der kleinen Fragmente ohne jegliche Kompetition ergeben haben (3.3.5.; Abb. 7b+c).

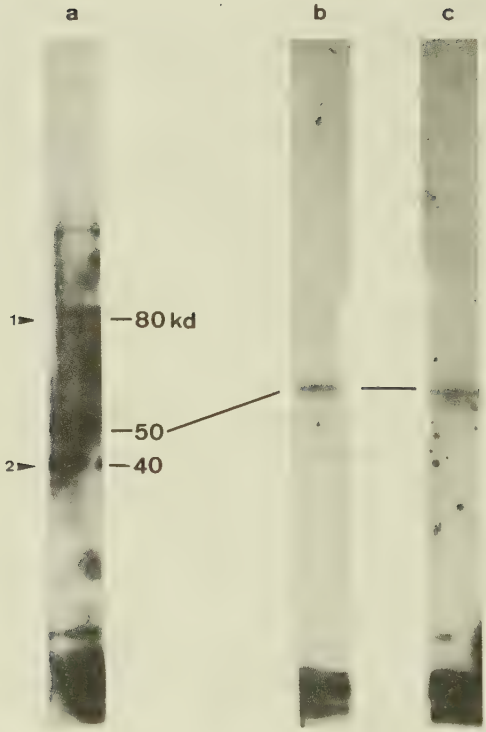

Abbildung 15: Bindung von Ma-Genstücken an MaP;
MaP in SDS-Polyacrylamidgel (7,5-15%) aufgetrennt, Transfer auf Nitrocellulose, Filter mit nicht markierter Ma-DNS$_{Bal-31}$ kompetiert;
(a) Bindung mit ^{32}P-markiertem 1,2 kb Hind III-Fragment,
(b) Bindung mit ^{32}P-markiertem 0,3 kb Hind III-Fragment,
(c) Bindung mit ^{32}P-markiertem 0,2 kb Hind III-Fragment.

3.3.7.4. Elektronenmikroskopische Darstellung der Bindung von Gesamt-Ma-DNS mit dem 80 kd-Protein

Nachdem durch die Bindungsversuche ein spezifisch bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kd gefunden werden konnte, sollte nun dieser DNS-Protein-Komplex auch im Elektronenmikroskop dargestellt werden. Damit sollte außerdem die Bindungsstelle genauer lokalisiert werden, da durch die Bindungsversuche alle Bindungen gezeigt werden, die mit Sequenzen möglich sind, die durch den Verdau von Bal-31 entfernt worden sind. Das heißt: Die Bindungen können sowohl an der terminalen Sequenz als auch an Sequenzen, die weiter innen liegen, erfolgen.

Zum Vergleich wurden auch elektronenmikroskopische Darstellungen von Bindungen mit dem 50 kd-Protein und als Kontrolle mit BSA und mit reiner DNS angefertigt. Das 80 kd- und das 50 kd-Protein wurden nach der Elektrophorese direkt aus dem Gel isoliert (2.13.), an Gesamt-Ma-DNS gebunden und der DNS-Protein-Komplex nach 2.15. für das Elektronenmikroskop gespreitet. Die Abb. 16a-e zeigen die Bindungen mit den verschiedenen Proteinen: (a) ohne Protein, (b) mit dem 80 kd-Protein, (d) mit dem 50 kd-Protein und (e) mit BSA. Man sieht außer in (b) keine DNS-Protein-Bindungen. Die Bindung des 80 kd-Proteins mit der DNS ist durch einen Punkt, der etwa den dreifachen Durchmesser der DNS hat, gekennzeichnet (→). Die Bindungsstelle liegt demnach zwischen 150 und 750 bp vom Ende der DNS-Stücke entfernt und scheint von der DNS- bzw. Gengröße abhängig zu sein, da mit zunehmender Größe der DNS-Stücke die Bindung weiter innen erfolgt. Weiterhin ist zu erkennen, daß die Bindung nur auf einer Seite der DNS-Stücke stattfindet.

Daraus muß man annehmen, daß es sich bei der bindenden Sequenz in allen Ma-DNS-Stücken um ein und diesel-

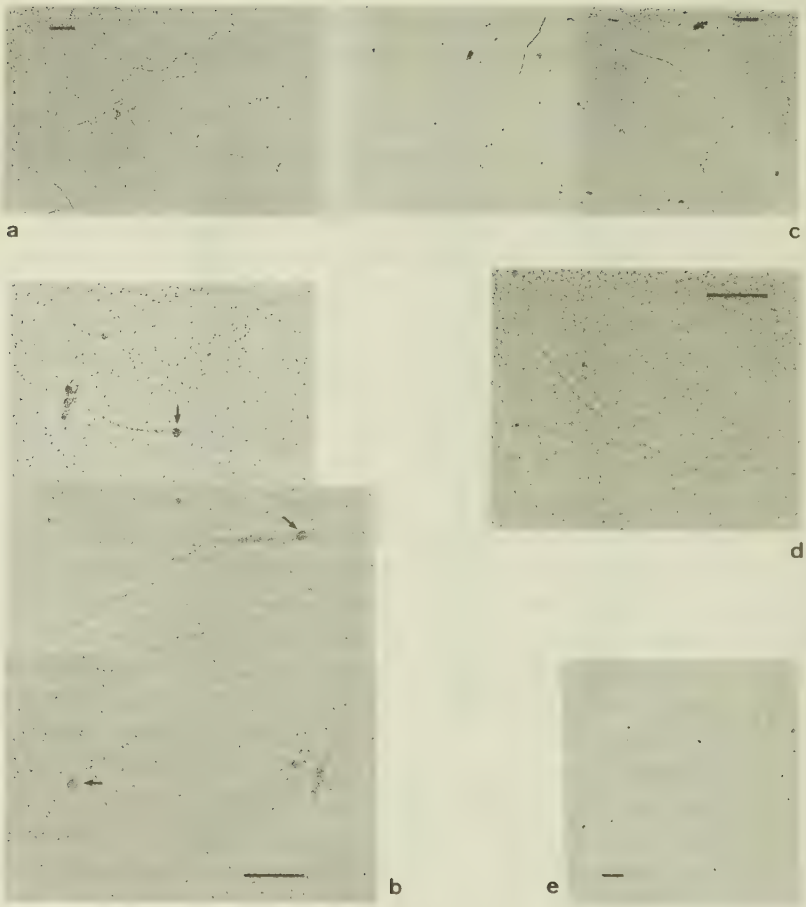

Abbildung 16: Elektronenmikroskopische Darstellung von DNS-Protein-Bindungen; Proteine mit 80, 50 und 40 kd direkt aus dem SDS-Polyacrylamidgel eluiert (2.13.), Bindung an Gesamt-Ma-DNS und EM-Aufbereitung nach 2.15.;
(a) reine Ma-DNS ohne Protein (Kontrolle),
(b) Ma-DNS nach Bindung mit 80 kd-Protein (→),
(c) Ma-DNS nach Bindung mit 40 kd-Protein,
(d) Ma-DNS nach Bindung mit 50 kd-Protein,
(e) Ma-DNS nach Bindung mit BSA;
Bar ≙ 0,2 µm.

be handelt, aber nicht um die terminale C_4A_4-Sequenz. Der betreffenden Sequenz und dem 80 kd-Protein müssen demnach auch eine wichtige, wahrscheinlich regulative, Funktion zugeschrieben werden.

3.3.8. Bindung mit terminaler C_4A_4-Sequenz an Makronukleusproteine

Die Bindungsversuche mit der Ma-DNS_{Bal-31} haben nicht zur Identifikation des an die terminale Sequenz bindenden Proteins geführt, und die bisherigen Bindungsversuche deuten darauf hin, daß sich spezifischere Bindungen eher mit definierten DNS-Stücken (3.3.5.) als mit komplexer DNS ergeben. Deshalb wurde nun die Suche nach diesem(n) Protein(en) durch Bindungen mit folgenden definierten terminalen Sequenz-Stücken angegangen: a) klonierte terminale Sequenz aus Oxytricha nova, b) SS-5'-C_4A_4-Sequenz und c) SS-3'-G_4T_4-Sequenz, die beide synthetisch hergestellt wurden[1)].

Die Abb. 17 zeigt die Bindungen eines 61 bp-DNS-Stükkes an die MaP. Dieses 61 bp große Fragment, das die terminale Sequenz enthält, ist Teil eines Ma-DNS-Stükkes aus Oxytricha nova, das mit pBR 322 als Vektor in E. coli kloniert wurde (Swanton et al., 1980). Durch den Verdau des rekombinierten Plasmids (pOH 7)[2)] mit den Restriktionsenzymen Alu I und Hae III (2.11.3.5.) wurde es reisoliert (Boswell et al., 1982) und für die Bindungsversuche am 3'-Ende mit ^{32}P markiert.

---

1) Die synthetischen Sequenzen stammen aus dem Labor von Prof. Dr. Schott vom chemischen Institut der Universität Tübingen.

2) Das rekombinierte Plasmid pOH 7 mit der terminalen Sequenz wurde freundlicherweise von Dr. L. Klobutcher (Univ. of Colorado, Boulder, USA) zur Verfügung gestellt (Swanton et al., 1980).

Zuerst wurde die Bindung mit dem 61 bp großen terminalen Sequenzstück an die MaP durchgeführt, dessen Bandenmuster in Abb. 17a zu sehen ist. Man erkennt eine deutliche Bande bei 40 kd und eine schwächere Bande etwas über dieser. Im niedermolekularen Bereich erscheinen die Banden der Core-Histone. Die Abb. 17b

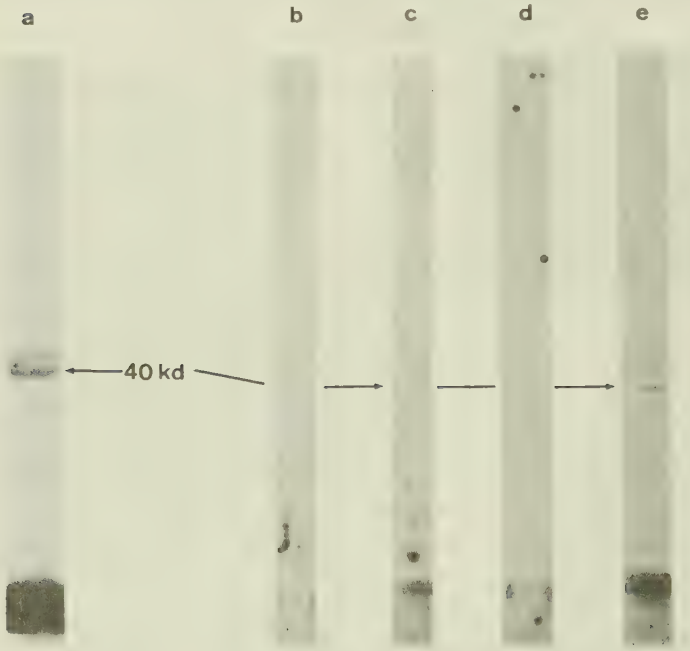

Abbildung 17: Bindung von terminalem, 61 bp großem C_4A_4-Sequenzstück an MaP;
MaP in SDS-Polyacrylamidgel (7,5-15%) aufgetrennt, Transfer auf Nitrocellulose, Bindung mit ^{32}P-3'-markiertem 61 bp-C_4A_4-Sequenzstück (3.3.8.);
(a) Filter nicht kompetiert,
(b) Filter mit Gesamt-Ma-DNS kompetiert,
(c) Filter mit Ma-DNS$_{Bal-31}$ kompetiert,
(d) Filter mit SS-Gesamt-Ma-DNS kompetiert,
(e) Filter mit SS-Ma-DNS$_{Bal-31}$ kompetiert,
Filter mit 1 x PbP gewaschen.

zeigt das Ergebnis der Bindung mit diesem 61 bp-Stück nach vorausgegangener Kompetition mit Gesamt-Ma-DNS. Wie zu erwarten war, verschwinden alle Banden, da alle Proteine von der im Überschuß zugegebenen nicht markierten Ma-DNS gebunden und überdeckt werden.

Um zu überprüfen, ob die in Abb. 17a zu sehende Bande nur auf eine unspezifische Bindung zurückzuführen ist oder nicht, wurde der Filter mit Ma-DNS$_{Bal-31}$, ohne diese terminale Sequenz, kompetiert und mit dem 61 bp-Fragment gebunden. Das Ergebnis, dargestellt in Abb. 17c, zeigt wiederum die 40 kd-Bande und zusätzlich eine Bande bei etwa 50 kd. Daß die Bande bei 40 kd hier schwächer ist als in 17a, ist auf die unspezifische Bindung der kompetitiven Ma-DNS$_{Bal-31}$ zurückzuführen.

Mit den in Abb. 17d+e dargestellten Versuchen sollte die Bindung noch einmal bestätigt und auch untersucht werden, ob es sich hierbei um ein nur unspezifisch Einzelstrang bindendes Protein handelt. Dazu wurden die Filter mit SS-Ma-DNS (17d) bzw. mit SS-Ma-DNS$_{Bal-31}$ (17e) kompetiert und die Bindung mit dem 61 kb-Stück durchgeführt. Die Ergebnisse daraus: Es ergeben sich dieselben Bandenmuster wie in Abb. 17b+c. Dabei zeigt das Erscheinen der 40 kd-Bande in 17e, daß es sich bei dieser Bindung nicht um ein nur Einzelstrang bindendes Protein handeln kann. Es zeigt aber, daß dieses 61 bp große DNS-Stück mit der terminalen Sequenz eine hohe Affinität zu diesem 40 kd-Protein hat. Das Fehlen der betreffenden Bande in Abb. 17d hingegen ist letztlich kein Beweis für ein Einzelstrang-sequenzspezifisch bindendes Protein, da die zur Kompetition eingesetzte Ma-DNS zu komplex ist und die terminale Sequenz in ihr enthalten ist.

Durch die Bindungen mit den synthetisch hergestellten terminalen Sequenz-DNS-Stücken an MaP sollten die mit

dem 61 bp großen Fragment erzielten Ergebnisse überprüft werden. Dazu wurden dieselben Versuchsansätze wie mit dem 61 kb-Fragment verwendet.

Die Bindung mit dem am 5'-Ende ^{32}P-markierten SS-5'-C_4A_4-Sequenz-Stück ergibt, ohne vorherige Kompetition des Filters, das in Abb. 18a abgebildete Bandenmuster. Man erhält ebenfalls eine deutliche Bande mit 40 kd und die Banden der Core-Histone neben nur wenigen und sehr schwachen anderen Banden. Letztere beruhen wahrscheinlich auf einer größeren an die Filter gebundenen Proteinmenge. Die Kompetition des Proteinfilters mit Gesamt-Ma-DNS mit anschließender Bindung des SS-5'-C_4A_4-Sequenz-Stückes führt zum Verschwinden nahezu aller Banden, wie bei dem Bindungsversuch mit dem 61 kb-Fragment der Abb. 17b. Um auch hier eine Spezifität des 40 kd-Proteins für die terminale Sequenz zu untermauern, wurde wiederum mit Ma-DNS_{Bal-31} kompetiert und mit dem SS-5'-C_4A_4-Sequenz-Stück gebunden. Das Resultat in Abb. 18c zeigt eine ebenso deutliche Bande bei 40 kd wie bei der Bindung ohne Kompetition (Abb. 18a) und ist somit ein weiteres Indiz für die Spezifität dieses 40 kd großen Proteins zu der terminalen Sequenz.

In den weiteren Bindungsversuchen mit dem zweiten synthetisch hergestellten terminalen Sequenz-Stück SS-3'-G_4T_4 konnten die bereits gewonnenen Ergebnisse weitere Bestätigung finden. Die Bindungen wurden dabei mit doppelsträngigem 5'-C_4A_4--3'-G_4T_4, das durch Renaturierung von ^{32}P-5'-endmarkiertem SS-3'-G_4T_4 mit nicht markiertem SS-5'-C_4A_4 gewonnen wurde, durchgeführt.

Das Bandenmuster der Bindung mit diesem terminalen Sequenz-Stück ohne Kompetition des Filters zeigt die Abb. 19a, und man erkennt wie schon in den Versuchen der Abb. 17a + 18a eine deutliche Bande mit 40 kd neben wenigen, ganz schwach ausgebildeten, anderen Banden.

Der Versuch der kompetitiven Inkubation mit Ma-DNS$_{Bal-31}$ und Bindung mit dem o.g. terminalen Sequenz-Stück zur Bestätigung der Spezifität der Bindung mit dem 40 kd-Protein ergab dieselben Resultate wie die Bindungsversuche, die in Abb. 17c + 18c zu sehen sind, nämlich eine deutliche Bande mit 40 kd (Abb. 19b).

3.3.8.1. Elektronenmikroskopische Darstellung der Bindung der terminalen C_4A_4-Sequenz mit dem 40 kd-Protein

Nachdem auch bei den Bindungsversuchen mit den terminalen C_4A_4-Sequenz-Stücken ein Protein mit hoher Affinität für diese Sequenz gefunden werden konnte, sollte auch diese Bindung im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. Damit sollte zum einen überprüft werden, ob die Bindung des 40 kd-Proteins tatsächlich mit der terminalen C_4A_4-Sequenz erfolgt, und gleichzeitig hoffte man auf eine Antwort über die mögliche Funktion des Proteins. Letzteres deshalb, weil angenommen wird, daß die gengroßen Ma-DNS-Moleküle an ihren terminalen C_4A_4-Sequenzen durch Proteine zusammengehalten werden könnten, um eine höhere Ordnung in der Struktur der DNS im Makronukleus zu erreichen (Lipps et al., 1982).

Die Durchführung des Versuchs entsprach den Bedingungen, wie sie bereits in 3.3.7.4. beschrieben wurden. So wurde das 40 kd-Protein ebenfalls direkt aus dem Gel eluiert und die Bindung und Spreitung des DNS-Protein-Komplexes nach 2.15. ausgeführt. Als Vergleich und Kontrolle dienten ebenso Bindungen mit dem 50 kd-Protein, mit BSA und mit reiner DNS ohne Protein, welche in den Abb. 16a-d zu sehen sind. Die Abb. 16c zeigt das Ergebnis der Bindung von Gesamt-Ma-DNS mit dem 40 kd-Protein. Man kann keine DNS-Protein-Interaktionen erkennen, sondern nur einzelne DNS-Moleküle wie nach

Spreitung von reiner DNS oder nach den Bindungen mit dem 50 kd-Protein und BSA (Abb. 16a, d + e).

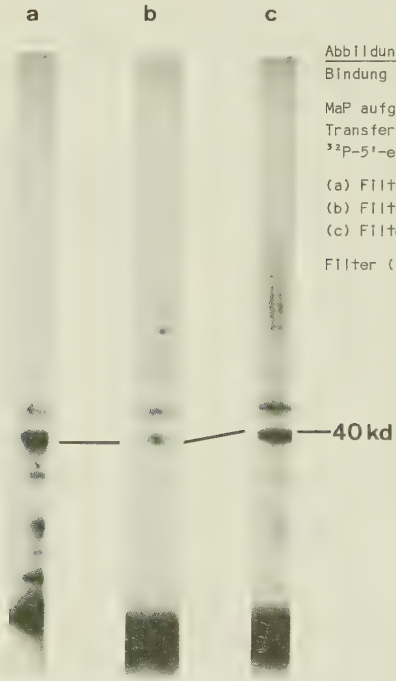

Abbildung 18:
Bindung von SS-5'-C_4A_4-Sequenz-Stück an MaP;

MaP aufgetrennt in SDS-Polyacrylamidgel (7,5-15%), Transfer auf Nitrocellulosefilter, Bindung mit ^{32}P-5'-endmarkiertem SS-5'-C_4A_4-Sequenz-Stück;

(a) Filter ohne Vorinkubation,
(b) Filter mit Gesamt-Ma-DNS kompetiert,
(c) Filter mit Ma-DNS_{Bal-31} kompetiert,

Filter (a-c) in 1 x PbP gewaschen.

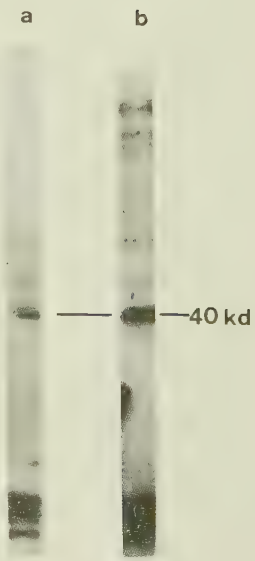

Abbildung 19:
Bindung von 3'-G_4T_4--5'-C_4A_4-Sequenz-Stück an MaP;

MaP in SDS-Polyacrylamidgel (7,5-15%) aufgetrennt, Transfer auf Nitrocellulosefilter, Bindung mit ^{32}P-5'-endmarkiertem v.g. Sequenz-Stück;
(a) Filter ohne Vorinkubation,
(b) Filter mit Ma-DNS_{Bal-31} kompetiert,
Filter in 1 x PbP gewaschen.

4. Diskussion

Auf Grund des Kerndimorphismus, der gengroßen Ma-DNS mit all ihren bereits erwähnten Besonderheiten, dem Auftreten von polytänen Riesenchromosomen und der unterschiedlichen Genaktivität der verschiedenen Kerne eignen sich die hypotrichen Ciliaten und damit auch die Stylonychia-Arten besonders, Genregulation und die strukturelle Organisation von DNS und Genom zu untersuchen. Die bisher dazu gemachten Untersuchungen beruhen hauptsächlich auf Arbeiten mit DNS und RNS. Da die DNS mit Proteinen, die die Struktur und Regulation der DNS wesentlich mitbestimmen, assoziiert ist (Paul und Gilmour, 1975; Stein, 1976; Herrick und Alberts, 1976a+b; Allfrey et al., 1975), wurden in dieser Arbeit Kernproteine von S. lemnae auf ihre DNS-bindenden Eigenschaften hin untersucht.

Dazu wurde zuerst die Proteinzusammensetzungen von Makro- und Mikronukleus und von Makronukleusanlagen analysiert. Die Proteine wurden durch Kochen der Kerne in SDS-Probenpuffer gelöst, in SDS-Polyacrylamidgradientengelen von 7,5-15% aufgetrennt und mit Coomassie-Brillant blue gefärbt. Die nach dieser Methode erhaltenen Bandenmuster weisen auf deutliche Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der verschiedenen Kerntypen hin. Berücksichtigt man die unterschiedlichen Funktionen, die Unterschiede im Genom, die unterschiedliche Genaktivität (Ammermann et al., 1974) und die unterschiedliche strukturelle DNS-Organisation der Kerne, so sind die Unterschiede in der Proteinzusammensetzung durchaus zu erwarten.

Ein großer Unterschied zwischen MiP und AnlP einerseits und MaP andererseits besteht darin, daß im Molekulargewichtsbereich über $5 \cdot 10^4$ d bei den MiP zwei und bei den AnlP fünf sehr deutliche Banden auftreten. Da-

bei sind die beiden Banden der MiP nicht identisch mit Proteinbanden der AnlP. Ein weiterer Unterschied ist der Anteil an Histonen bezogen auf die Nichthistonproteine, der bei den MiP, im Gegensatz zu den MaP und AnlP, recht gering ist. Gemeinsam sind allen nur Proteine mit 50 und 40 kd, die möglicherweise wichtige Funktionen haben könnten, weil sie in allen drei Kerntypen auch mit am häufigsten vorkommen.

Der Grund für die doch große Anzahl von Proteinen im generativen und Stoffwechsel inerten Mikronukleus liegt wahrscheinlich in der höheren strukturellen Ordnung der DNS und damit der Organisation des Genoms. Ähnliches gilt auch für die AnlP. Bei den MaP handelt es sich wahrscheinlich nicht nur um Strukturproteine, da dieser Kern eine hohe Genaktivität besitzt und deshalb auch Proteine mit regulatorischen Funktionen vorhanden sein müssen. Wie hoch letztlich der Anteil an strukturellen Proteinen (Laminaproteine etc.) ist, kann mit diesen Untersuchungen nicht genau geklärt werden. Der Vergleich der Proteine von Chromatin aus dem Makronukleus, das über Sepharose 4B gereinigt wurde, mit Gesamt-MaP deutet auf einen prozentual höheren Anteil an Strukturproteinen hin. Dieser vermehrte Gehalt an Proteinen mit strukturellen Funktionen würde auch damit im Einklang stehen, daß es genregulatorisch wirkende Proteine gibt, die in nur äußerst geringen Konzentrationen in den Kernen bzw. Zellen vorkommen und wahrscheinlich auch deshalb nicht mit dieser Methode erfaßt werden können. Ein Beispiel dafür ist das Lac repressor protein, das in nur 10 Kopien pro Zelle vorkommt (Alberts et al., 1983).

Die Suche nach DNS-bindenden Proteinen wurde durch Bindung von ^{32}P-markierter DNS an die auf Nitrocellulosefilter immobilisierten Proteine angegangen (Bowen et al., 1980). Der elektrophoretische Transfer ermög-

lichte es, alle Proteine in ausreichender Menge, abhängig vom jeweiligen Molekulargewicht, an die Nitrocellulosefilter zu binden. So wurden auch Proteine transferiert, die nach Färbung mit Coomassie-Brillant blue im Gel nicht sichtbar waren, wie die Bindungsversuche aus 3.3.1.-3. gezeigt haben. Bei den Bindungsversuchen traten in den Autoradiographien manchmal ein hoher Background und Schmier auf. Dies konnte auch durch längeres und intensiveres Waschen nicht beseitigt werden. Die Ursachen hierfür konnten leider nicht geklärt werden, aber es scheint, daß durch Kompetition der Proteinfilter mit nicht markierter DNS diese Effekte sich erheblich verringerten.

Die Bindungsversuche mit Ma-, Anl-, KT- und E. coli-DNS haben gezeigt, daß die MaP und AnlP sowohl die homologe als auch die heterologe DNS zu binden vermögen. Dies steht in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen von Johnson et al. (1975), daß mehr als 90% der DNS-bindenden Proteine von Novikoff-Hepatoma-Zellen an KT- und E. coli-DNS binden, und mit Untersuchungen von van den Broek et al. (1973), daß ca. 87% der DNS-bindenden Proteine aus Mäuseleberzellen an E. coli-DNS binden. Größere Intensitätsunterschiede einzelner Banden zwischen den Bandenmustern nach Bindung mit heterologer und der eigentlich spezifischeren homologen DNS sind auch nicht unbedingt zu erwarten. Nicht zuletzt deshalb, weil diese unspezifischen Bindungen hauptsächlich auf Ladungsunterschiede zwischen Proteinen und DNS zurückzuführen sind (Berg et al., 1982). Nun wäre es aber auch denkbar, daß eine sehr komplexe, heterologe DNS zufällig die gleichen Sequenzen trägt wie die Ma-DNS, und auf Grund dessen eine Bindung zustande kommt. Darüberhinaus wird von Proteinen berichtet, die zwar in vitro, aber nicht in vivo an die DNS binden (Tsai und Green, 1972).

Ein weiteres Problem für den Nachweis von DNS-bindenden Proteinen bei dieser Methode besteht darin, daß bei der Isolierung und Auftrennung in SDS-Gelen die Struktur von Proteinen durch Spaltung in ihre Untereinheiten verloren gehen kann und diese dadurch nicht mehr in der Lage sind, spezifisch an die DNS zu binden (Bowen et al., 1980).

Der deshalb wohl wichtigste Schritt für eine Interaktion von DNS und Proteinen ist das vollständige Renaturieren der Proteine. So weisen Bowen et al. (1980) darauf hin, daß es möglicherweise sogar nötig scheint, für jedes Protein eine spezielle Renaturierungsprozedur zu entwickeln, um Bindungen mit allen Proteinen zu erhalten. Obwohl bei meinen Versuchen die homologe als auch die heterologe DNS an alle MaP und AnlP binden, ist nicht davon auszugehen, daß das hier verwendete Renaturierungsverfahren ausreichend war.

Die Stabilität und eine daraus vielleicht abzuleitende Spezifität einer Bindung soll auch durch unterschiedlich langes Waschen der Filter nach der Bindungsreaktion nachgewiesen werden können. Dabei geht man davon aus, daß sich spezifische DNS-Protein-Interaktionen schwerer wieder lösen als unspezifische Bindungen (Riggs et al., 1970; Hinkle und Chamberlin, 1972). Jedoch haben hier längeres Waschen in 1 x PbP, selbst das Waschen der Filter über Nacht, zu keinen Unterschieden in den Bandenmustern von Bindungen mit heterologer und homologer DNS, die normale Zeit gewaschen worden sind, geführt.

Da DNS-Protein-Komplexe gewöhnlich in höheren Salzkonzentrationen dissoziieren, wurde untersucht, inwieweit sich die Erhöhung der NaCl-Konzentration während der Bindungsreaktion und beim Waschen der Filter auf die Bindungsfähigkeit von DNS mit Proteinen auswirkt (vgl. Bowen et al., 1980). Keine Veränderungen im Bandenmus-

ter ergab sich nach Waschen der Filter mit 150 mM NaCl in 1 x PbP (nicht dargestellt). Das Waschen in 0,5 M NaCl führte zu einem drastischen Rückgang der Bindungen (Abb. 5a). Einige Banden verschwinden völlig, und die noch verbleibenden sind deutlich schwächer geworden. Ein weiterer stetiger Rückgang der Bindungsintensität bis zum Teil völligen Verschwinden aller Banden erfolgte nach dem Waschen in 1 und 2 M NaCl in 1 x PbP (Abb. 5b+c). Wird die Salzkonzentration auf 0,5, 1 oder 2 M NaCl schon während der Bindungsreaktion erhöht, so kommt überhaupt keine Bindung mehr zustande; die Autoradiographie zeigt keine Banden (nicht dargestellt). Also geben auch diese Versuche keine Hinweise auf mögliche spezifisch DNS-bindende Proteine.

Da die DNS im Makronukleus in sogenannten "gene-sized pieces" (Prescott et al., 1973; Elsevier et al., 1978; Lipps und Steinbrück, 1978) vorliegt, ist anzunehmen, daß sämtliche für die Regulation eines Gens notwendigen Sequenzen auf solch einem Genstück liegen müssen (Lipps et al., 1978). Diese Tatsache und die relativ einfache Möglichkeit, ein Ma-Gen bzw. -Genstück isolieren und klonieren zu können, waren Grundlage für die Überlegung, daß mit einem definierten DNS-Stück eher ein spezifisch DNS-bindendes Protein zu finden sein müßte. Deshalb wurden Bindungen an MaP mit einem einzelnen, zufällig ausgewählten 1,7 kb großen Ma-Genstück durchgeführt.

Für das ganze 1,7 kb-Genstück und das 1,2 kb große Hind III-Fragment konnten jedoch keine Proteine, die spezifisch an diese Stücke binden, nachgewiesen werden, da alle Proteine mit ihnen eine Bindung eingehen. Dies ist wahrscheinlich auf die immer noch zu großen und damit zu komplexen DNS-Stücke zurückzuführen.

Erst die Bindungen mit den kleinen Hind III-Fragmenten von 0,3 und 0,2 kb führten zu jeweils nur einer Bande bei 50 kd, die DNS-Histon-Bindungen nicht berücksichtigt. Ob diese Bande auf einer spezifischen Bindung

beruht oder nur deshalb ausgebildet wird, weil die DNS an das mengenmäßig am meisten vorkommende Protein bindet, kann nicht gesagt werden. Trotzdem scheinen für die Suche nach spezifisch DNS-bindenden Proteinen kleinere und definierte DNS-Stücke notwendig zu sein, was auch durch die Bindungen mit den terminalen C_4A_4-Sequenz-Stücken (3.3.8.) gezeigt wird.

Im Makronukleus, aber nicht im Mikronukleus, von Stylonychia findet man die DNS neben der B- auch in Z-Form vor (Lipps et al., 1983). Man nimmt an, daß Z-DNS eine wichtige Rolle bei der Regulation von DNS spielt, und daß dies in engem Zusammenhang mit Proteinen geschieht, die spezifisch an diese Z-DNS binden (Nordheim et al., 1982). Eine wichtige Funktion solcher Proteine könnte es beispielsweise sein, die Z-Konfiguration der DNS zu stabilisieren. Inzwischen konnten auch Z-DNS-bindende Proteine bei Drosophila melanogaster gefunden werden (Nordheim et al., 1982). Die hier gemachten Untersuchungen haben ergeben, daß einige MaP aus Stylonychia die Z-DNS zu binden vermögen, es aber nicht möglich ist, daraus eine Z-DNS-spezifische Bindung eines bestimmten Proteins abzuleiten (Abb. 8), da dieselben Proteine mit wesentlich größerer Intensität auch DNS in B-Form (Ma-DNS) binden. Ein kleiner Unterschied ist jedoch, daß die Banden bei 50 und 40 kd nach Bindung mit Ma-DNS viel stärker sind als eine Bande mit 30 kd, während diese Banden nach Bindung mit Z-DNS gleich stark erscheinen. Dies könnte auf mögliche spezifische Bindungseigenschaften des 30 kd-Proteins für Z-DNS hindeuten, es bedarf dazu allerdings noch weiterer Untersuchungen und muß deshalb noch Spekulation bleiben.

Alle "gene-sized" Ma-DNS-Stücke besitzen an ihren Enden die gleichen inverted repeat Sequenzen (Wesley, 1975; Oka et al., 1980; Klobutcher et al., 1981). Welche Funktion sie haben, ist allerdings noch völlig

unklar, jedoch nehmen Lipps et al. (1982) an - sie entwickelten nach Untersuchungen an Oxytricha ein Modell -, daß die "gene-sized" Ma-DNS-Stücke an diesen Enden zusammengehalten werden, um eine höhere Chromatinstruktur im Makronukleus zu erhalten.

Bei der Suche nach diesem(n) Protein(en) wurde dann so vorgegangen, daß zum einen mit Ma-DNS_{Bal-31}, bei der die terminalen Sequenzen fehlen (3.3.7.), und zum anderen nur mit terminalen C_4A_4-Sequenz-Stücken (3.3.8.) an die MaP gebunden wurde. Die Überlegung war: Wenn ein Protein spezifisch an diese terminale Sequenz binden würde, so müßte es in beiden Fällen in den autoradiographischen Bandenmustern an ein und derselben Bande zu erkennen sein. Zudem erschien es nach den bisher gemachten Versuchen (3.3.1.-3., 3.5., 3.6.) notwendig, die Proteinfilter mit nicht markierter DNS zu kompetieren, um unspezifische Bindungen weitgehend abzudecken (Gilmour et al., 1981).

Nun haben die Bindungsversuche mit Ma-DNS_{Bal-31} (3.3.7.) zu einer Proteindoppelbande mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kd geführt, welche durch die Bindung mit Sequenzen zustande kommt, die durch den Verdau mit der Exonuklease Bal-31 von den Ma-Genstücken entfernt worden sind. Daß es sich dabei um eine spezifische Bindung von Stylonychia-Ma-DNS handeln muß, konnte durch den Kontrollversuch mit Lachssperma-DNS (Abb. 10c) gezeigt werden.

Die Annahme, es handle sich hier um das an die terminale Sequenz bindende Protein, hat sich jedoch nicht bestätigt. Die ersten Hinweise dafür lieferten die Bindungsversuche mit den terminalen C_4A_4-Sequenz-Stücken, die nämlich keine Bande mit 80 kd, sondern primär eine Bande bei 40 kd ergaben. Desweiteren wurde dies durch die Bindungsversuche mit den Ma-Genstücken (3.3.5. + 3.3.7.3.) unterstützt, bei welchen die Bindungen mit

dem 1,2 kb großen Fragment mit der terminalen Sequenz nach Kompetition mit Ma-DNS$_{Bal-31}$ (Abb. 15a) sowohl die Bande bei 80 kd (→ 1) als auch eine deutliche Bande bei 40 kd (→ 2) ergeben haben. Letzteres ist insofern von Bedeutung, da die Bande bei 40 kd normal mit der gleichen Intensität wie die Bande bei 50 kd auftritt. Die Bindungen mit den kleinen, 0,3 und 0,2 kb großen, Hind III-Fragmenten hingegen führen weder zu einer Bande bei 80 kd noch zu einer Bande bei 40 kd (Abb. 15b+c).
Den wirklichen Beweis erhielt man dann durch die Darstellung der Bindung des 80 kd-Proteins mit Gesamt-Ma-DNS im Elektronenmikroskop (Abb. 16b), womit diese Bindung auch visuell bestätigt werden konnte, und zugleich eine genauere Lokalisation der Bindungsstelle möglich wurde. Demnach liegt die Bindungsstelle auf den Ma-DNS-Stücken (Genen) nicht am gleichen Ort, so wie man dies vielleicht erwarten würde, sondern variiert zwischen 150 - 750 bp vom Ende der DNS-Stücke. Die Entfernung der Bindungsstelle vom Ende scheint dabei mit der Größe der DNS-Stücke (Gene) korreliert zu sein, das heißt: Je größer ein Gen, desto weiter innen ist die Bindungsstelle lokalisiert. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen außerdem, daß die Bindung nur auf einer Seite eines DNS-Moleküls (Gens) erfolgt, und daß die bindende Sequenz in allen Ma-Genstücken enthalten zu sein scheint, da die DNS-Protein-Komplexe bei über 80% der verschieden großen DNS-Moleküle zu beobachten sind.

Welche Funktionen das Protein haben könnte, ist allerdings noch völlig unklar. Auch weitere Bindungsversuche konnten keine wesentlichen Aufschlüsse über diese Protein-DNS-Bindung geben. So konnte beispielsweise nicht geklärt werden, ob es primär ein Einzel- oder Doppelstrang bindendes Protein ist (Abb. 11) und ob die geringe Stabilität der Bindung, wie durch Erhöhung

der Salzkonzentration beim Waschen der Filter gezeigt wurde (Abb. 12), eher auf eine regulatorische oder strukturelle Eigenschaft hinweist.

Da die Sequenz, an die das Protein bindet, in allen "gene-sized" DNS-Molekülen vorkommt, wäre es denkbar, daß es vielleicht eine Rolle bei der Genregulation (Transkription) oder DNS-Replikation spielen könnte. Dabei könnte es sich möglicherweise um die jeweiligen Initiationsstellen (Origins) handeln, wie vielleicht durch Beobachtung von sich replizierender Ma-DNS im EM gezeigt werden könnte. Dies würde ferner bedeuten, daß es sich bei dieser Protein-Doppelbande möglicherweise um Untereinheiten von RNS- bzw. DNS-Polymerase handeln könnte, worauf Vergleiche mit der DNS-Polymerase aus Eukaryonten, die aus Monomeren von 80-90 kd aufgebaut ist, und mit Untereinheiten der DNS-abhängigen RNS-Polymerase hindeuten (Sengbusch, 1978). Aufschluß über Funktion von Protein und Sequenz könnten beispielsweise in vitro-Experimente geben, bei denen neben Ma-DNS und dem 80 kd-Protein alle vier Nukleotidtriphosphate mit zweiwertigen Ionen, die für Transkription und Replikation notwendig sind, zugegeben und die DNS-Protein-Komplexe nach verschiedenen Inkubationszeiten im EM beobachtet werden.

Desweiteren könnte auch die Bindungsregion durch weitere Bindungsversuche mit einem definierten Ma-DNS-Stück (Gen), vor allem mit immer kleineren Restriktionsfragmenten von diesem Stück, mit anschließenden Sequenzanalysen eindeutig bestimmt werden.

Wie schon erwähnt, ergaben die Bindungsversuche mit den terminalen C_4A_4-Sequenz-Stücken jeweils eine Bande mit einem Molekulargewicht von 40 kd (3.3.8.). Dieses Protein zeichnet sich durch eine hohe Affinität zu dieser terminalen Sequenz aus und scheint spezifische Bindungseigenschaft zu haben. Diese Aussage stützt sich

dabei auf folgende Überlegungen: Es konnte gezeigt werden, daß das Protein mit 80 kd nicht das an die terminale Sequenz bindende Protein ist. Die Bindungen mit den Ma-Genstücken (3.3.5., 3.3.7.3.) ergaben eine Bande bei 40 kd nur bei den großen, die terminale Sequenz tragenden, Stücken. Wichtig ist hierbei vor allem, daß nach Kompetition mit Ma-DNS_{Bal-31} und Bindung des 1,2 kb großen Stückes die Bande bei 40 kd sehr deutlich und viel stärker auftritt als die Bande bei 50 kd. Würde die Bindung bei der 40 kd-Bande unspezifisch sein, so müßten die Banden bei 40 und 50 kd mit gleicher Intensität erscheinen, wie es bei den Bindungen mit sehr komplexer (unspezifischer) DNS der Fall ist. Daß es sich mit allergrößter Wahrscheinlichkeit nicht um eine unspezifische Bindung handelt, wird auch durch die Bindungsversuche mit den kleinen, 0,3 und 0,2 kb großen, Hind III-Fragmenten, die weder die terminale noch die für die Bindung des 80 kd-Proteins notwendige Sequenz tragen, unterstützt. Man erhält nämlich primär nur eine Bande bei 50 kd. Auch scheint die Intensität der Bande mit 40 kd bei Bindung mit Ma-DNS_{Bal-31} nach Kompetition der Filter mit Gesamt-Ma-DNS gegenüber der Intensität dieser Bande bei umgekehrtem Bindungsexperiment abzunehmen (3.3.7., Abb. 10a+b).

Weitere Hinweise für die Spezifität des 40 kd-Proteins geben die Bindungsversuche mit den C_4A_4-Sequenzen selbst, da die Bindungen mit den verschiedenen C_4A_4-Sequenzstücken alle dieselbe deutliche Bande bei 40 kd ergeben und Bindungen mit anderen Nichthistonproteinen nur sehr schwach oder gar nicht stattfinden, obwohl sie in gleicher oder gar größerer Menge vorkommen als das Protein mit 40 kd. Also müßte man bei einer unspezifischen Bindung auch hier noch mehr, vor allem aber auch Banden mit mindestens gleicher Intensität bekommen.

Weiter haben auch die Bindungsversuche mit S1-Ma-DNS (3.3.7.2.) durchweg Banden bei 40 kd ergeben, zeigen jedoch nicht, wie beabsichtigt, ob die Bindung mit dem überstehenden 3'-G_4T_4-Stück eingegangen wird.

Der endgültige Beweis für die Bindung des 40 kd-Proteins an die terminale C_4A_4-Sequenz konnte durch die Darstellung der DNS-Protein-Bindung im EM, entsprechend der Bindung mit dem 80 kd-Protein, nicht erbracht werden. Dies widerlegt aber die durch die Bindungsversuche gewonnene Annahme nicht, daß das 40 kd-Protein eine hohe Affinität zu der terminalen C_4A_4-Sequenz besitzt, da wahrscheinlich die hier verwendete Methode nicht empfindlich genug ist, um das doch relativ kleine Protein an der DNS im EM sichtbar zu machen.

Daß unter den gegebenen Bedingungen im EM auch keine anderen, höheren DNS-Strukturen, End-zu-End Verbindungen von DNS-Molekülen, zu beobachten sind, wie sie Lipps et al. (1982) durch Darstellung von Chromatin aus Oxytricha nova im EM schon gezeigt haben, scheint die Aussage von Lipps et al. (1982) zu bestätigen, daß noch mehrere Faktoren notwendig sind, um solch eine höhere DNS-Struktur zu erhalten.

Ob es sich hierbei vielleicht um eine kovalente Bindung handelt, ähnlich dem Protein, das an das 5'-Ende von Adenovirus-DNS, die ebenfalls terminale inverted repeat Sequenzen tragen, bindet (Rekosh et al., 1977), kann nur vermutet werden, da dies durch diese Versuche nicht nachgewiesen werden kann. Dies könnte möglicherweise durch Beobachtung von Ma-DNS, die nicht mit proteolytischen Enzymen isoliert wurde, im EM gezeigt werden. Obwohl die bisherigen Untersuchungen darauf hinweisen, daß eine Bindung zwischen der terminalen C_4A_4-Sequenz und einem Protein zu existieren scheint, müssen Aussagen über mögliche Funktionen des Proteins weiter ungeklärt und hypothetisch bleiben. Mehr Klarheit darüber könnten vielleicht immunologische Unter-

suchungen durch Antikörperreaktionen mit dem 40 kd-Protein, sowohl in vivo als auch in vitro, erbringen.

Insgesamt haben die hier gemachten Untersuchungen gezeigt, daß durch geeignete Kompetitionsbedingungen, besonders in Verbindung von Bindungsreaktionen mit definierten DNS-Sequenz-Stücken, die Identifikation von Sequenz-spezifischen DNS-bindenden Proteinen gut möglich ist. Dabei sind die "gene-sized" Ma-DNS-Moleküle der Ciliaten von großem Vorteil, da sie relativ einfach zu isolieren und durch Restriktionsverdaue kleine definierte DNS-Fragmente zu bekommen sind.

5. Zusammenfassung

Zunächst wurden die Proteinzusammensetzungen von Mikro-, Makronukleus, Makronukleusanlagen und Chromatin aus dem Makronukleus durch Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgradientengel von 7,5-15% und Färbung mit Coomassie-Brillant blue untersucht. Der Vergleich der für jeden Kerntyp spezifischen Bandenmuster zeigt deutliche qualitative und quantitative Unterschiede in der Proteinzusammensetzung.

Für den Nachweis von DNS-bindenden Proteinen wurden die Proteine direkt aus dem Gel elektrophoretisch (Western-blotting) auf Nitrocellulosefilter transferiert und radioaktiv markierte DNS an diese gebunden. Die Bindungen haben ergeben, daß sowohl homologe (Ma-, Anl-DNS) als auch heterologe (KT-, E. coli-DNS) DNS an alle Kernproteine der verschiedenen Kerntypen bindet. Eine Sequenzspezifität wird dabei nicht beobachtet, was vor allem auf Ladungsunterschiede zwischen den Phosphatresten der DNS und den basischen Proteinresten und auf Größe und Komplexität der DNS zurückzuführen ist. Auch ist die Stabilität der DNS-Protein-Bindungen in höheren Salzkonzentrationen äußerst gering, da die meisten Bindungen nach Waschen mit 0,5 M NaCl disoziieren und die Intensität der Banden bis zum Teil völligen Verschwinden von Banden enorm zurückgeht.

Bindungen von Z-DNS an MaP haben zwar gezeigt, daß MaP die Z-DNS zu binden vermögen, jedoch war daraus keine Spezifität eines dieser Proteine zu erkennen.

Es konnte gezeigt werden, daß durch Kompetition der Proteinfilter mit unspezifischer, nicht markierter DNS und Bindung mit definierten DNS-Stücken (je kleiner desto besser) sequenzspezifisch bindende Proteine eher zu finden sind.

So konnte durch Bindung von klonierten und synthetisch hergestellten C_4A_4-Sequenzstücken an MaP eine verstärkte Affinität zu der terminalen C_4A_4-Sequenz der gengroßen Ma-DNS-Moleküle für ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kd nachgewiesen werden.

Desweiteren konnte ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kd, nach Bindung mit Ma-DNS_{Bal-31} an MaP, als spezifisch an gemeinsame Ma-DNS-Sequenzen bindend identifiziert werden. Diese Sequenz liegt an einem Ende, in Abhängigkeit von der Größe der Ma-Genstücke, ca. 150-750 bp weit innen. Diese Aussagen konnten durch Darstellung dieser DNS-Protein-Interaktion im EM gewonnen werden. Da die Sequenz in allen Ma-Genen enthalten ist, könnte sie möglicherweise die Initiationsstelle für DNS-Replikation oder für Transkription darstellen.

6. Literaturverzeichnis

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, D. (1983): Molecular Biology of the Cell. The Cell Nucleus. Chapter 8, 396-483. Garland Publishing, Inc. N.Y., USA

Alberts, B. and Sternglaz, R. (1977): Recent Excitement in the DNA Replication Problem. Nature 269, 655

Allfrey, V.G., Inoue, A., Karn, J., Johnson, E.M., Good, R.A. and Hadden, J.W. (1975): Sequence-specific binding of DNA by non-histone proteins and their migration from cytoplasm to nucleus during gene activation. Ciba Found. Symp. 28 (ns): The structure and function of Chromatin. 199-228

Ammermann, D. (1965): Cytologische und genetische Untersuchungen an dem Ciliaten Stylonychia mytilus Ehrenberg. Arch. Protistenk. 108, 109-152

Ammermann, D. (1971): Morphology and Development of the Macronuclei of the Ciliates Stylonychia mytilus and Euplotes aediculatus. Chromosoma (Berl.) 33, 209-238

Ammermann, D., Steinbrück, G., Berger, L.v. and Hennig, W. (1974): The Development of the Macronucleus in the Ciliated Protozoan Stylonychia mytilus. Chromosoma (Berl.) 45, 401-429

Ammermann, D. and Schlegel, M. (1983): Characterization of Two Sibling Species of the Genus Stylonychia (Ciliata, Hypotricha): S. mytilus Ehrenberg, 1838 and S. lemnae n. sp. I. Morphology and Reproductive Behavior. J. Protozoology 30 (2), 290-294

Anderson, W.F., Ohlendorf, D.H., Takeda, Y. and Mathews, B.W. (1981): Structure of the cro repressor from bacteriophage λ and its interaction with DNA. Nature 290, 754-758

Berg, O.G., Winter, R.P. and Hippel, P.H. von (1982): How do genome regulatory proteins locate their DNA target sites? Trends Biochem. Sci. 7, 52-55

Birnboim, H.L. and Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedur for screening recombinant plasmid DNA. Nuc. Ac. Res. 7, 1513-1523

Bollum, F.J. (1974): Terminal deoxynucleotidyl transferase. The Enzymes 10, 145

Boswell, R.E., Klobutcher, L.A. and Prescott, D.M. (1982): Inverted terminal repeats are added to genes during macronuclear development in Oxytricha nova. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79, 3255-3259

Bowen, B., Steinberg, J., Laemmli, U.K. and Weintraub, H. (1980): The detection of DNS-binding proteins by protein blotting. Nuc. Ac. Res. 8, 1-20

Broek, H.W.J. van den, Nooden, L.D., Sevall, J.S. and Bonner, J. (1973): Isolation, Purification and Fractionation of Nonhistone Chromosomal Proteins. Biochemistry 12, 229

Burnette, N.W. (1981): "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. Anal. Biochem. 112, 195-203

Champoux, J.J. (1978): Proteins that Affect DNS Conformation. Annu. Rev. Biochem. 47, 449-479

Chaconas, G. and Sande, J.A. van de (1980): 5'-^{32}P Labeling of RNA and DNA restrictionfragments. Methods Enzymol. 65, 75

Clewell, D.B. and Helsinki, D.R. (1969): Supercoiled circular DNA-protein-complex in E. coli: Purification and induced conversion to an open circular DNA form. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 62, 1159-1166

Clewell, D.B. (1972): Nature of Col E1 plasmid replication in the presence of Chloramphenicol. J. Bacteriol. 110, 667-676

Clowes, R.C. and Hayes, W. (1968): Experiments in microbial genetics. John Wiley & Sons Inc. New York

Coleman, J.E. and Oakley, J.L. (1979): Physical chemical studies of the structure and function of DNA-binding (helix-destabilizing) proteins. Crit. Rev. Biochem. 7, 247-290

Davis, R.W. and Hyman, R.W. (1970): Physical Locations of the in vitro RNA Inition Site and Termination Sites of T7M DNA. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 35, 269

Denhardt, D.J. (1966): A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 641-646

Elsevier, S.M., Lipps, H.J. and Steinbrück, G. (1978): Histone genes in macronuclear DNA of the Ciliate Stylonychia mytilus. Chromosoma (Berl.) 69, 291-306

Engelke, D.R., Ny, S.-Y., Shastry, B.S. and Roeder, P.G. (1980): Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. Cell 19, 717-728

Gellert, M. (1981): DNA topoisomerasen. Annu. Rev. Biochem. 50, 879-910

Gilmour, R.S., Lang, A., Gu, J.R., Johnston, C. and Paul, J. (1981): DNA Binding Proteins in Chromatin Structure and Funktion. Cell Biol. Int. Reports 5, 45-53

Guerry, P., Leblanc, D.J. and Falkow, S. (1973): General Method for the Isolation of Plasmid Deoxyribonucleic Acid. J. Bacteriol. 116, 1064-1066

Herrick, G. and Alberts, B. (1976a): Purification and Physical Characterization of Nucleic Acid Helix-unwinding Proteins from Calf Thymus. J. Biol. Chem. 251, 2124-2132

Herrick, G. and Alberts, B. (1976b): Nucleic Acid Helix-Coil Transitions Mediated by Helix-unwinding Proteins from Calf Thymus. J. Biol. Chem. 251, 2133-2141

Hinkle, D.C. and Chamberlin, M.J. (1972): Studies of the Binding of E. coli RNA polymerase to DNA. J. Mol. Biol. 70, 157-185

Johnson, J.D., St.John, T. and Bonner, J. (1975): DNA-Binding proteins from Novikoff Hepatoma Cells. Biochem. Biophys. Acta 378, 424

Kavenoff, R. and Zimm, B.H. (1973): Chromosome-Sized DNA Molecules from Drosophila. Chromosoma (Berl.) 41, 1-27

King, J. and Laemmli, U.K. (1971): Polypeptides of tail fibres of Bacteriophage T4. J. Mol. Biol. 62, 465-477

Klobutcher, L.A., Swanton, M.T., Donini, P. and Prescott, D.M. (1981): All gene-sized DNA molecules in four species of Hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3'-terminus. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78, 3015-3019

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680-685

Lafer, E.M., Möller, A., Nordheim, A., Stollar, B.D. and Rich, A. (1981): Antibodies specific for left-handed Z-DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78, 3546-3550

Lawn, R.M., Herrick, G., Heumann, J.D. and Prescott, D.M. (1977): The gene-sized DNA Molecules in Oxytricha. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 42, 483-492

Lipps, H.J., Sapra, G.R. and Ammermann, D. (1974): The Histones of the Ciliated Protozoan Stylonychia mytilus. Chromosoma (Berl.) 45, 273-280

Lipps, H.J. and Morris, N.R. (1977): Chromatin structure in the Nuclei of the Ciliate Stylonychia mytilus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 230-234

Lipps, H.J. and Steinbrück, G. (1978): Free Genes for rRNAs in the Macronuclear Genome of the Ciliate Stylonychia mytilus. Chromosoma (Berl.) 69, 21-26

Lipps, H.J., Nock, A., Riewe, M. and Steinbrück, G. (1978): Chromatin structure in the macronucleus of the ciliate Stylonychia mytilus. Nuc. Ac. Res. 5, 4699-4709

Lipps, H.J., Gruissem, W. and Prescott, D.M. (1982): Higher order DNA structure in macronuclear chromatin of the hypotrichous ciliate Oxytricha nova. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79, 2495-2499

Lipps, H.J., Nordheim, A., Lafer, E.M., Ammermann, D., Stollar, D.B. and Rich, A. (1983): Antibodies against Z-DNA React with the Macronucleus but not the Micronucleus of the Hypotrichous Ciliate Stylonychia mytilus. Cell 32, 435-441

Lowry, O.H., Rosenbough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275

Mandel, M. and Higa, A. (1970): Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53, 159-162

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982): Molecular cloning. Cold Spring Harbor Labor.

Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980): Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. Methods Enzymology 65, 499

Miller, J.H. and Reznikoff, W.S., Eds (1978): The Operon. Cold Spr. Har. monogr. ser., Cold Spr. Harb. Lab., N.Y.

Müller-Hill, B. (1971): Der lac-Repressor. Angew. Chemie 83, 195

Nock, A. (1981): RNA and Macronuclear Transcription in the Ciliate Stylonychia mytilus. Chromosoma (Berl. 83, 209-220

Nordheim, A., Tesser, P., Azorin, F., Kwon, Y.H., Möller, A. and Rich, A. (1982): Isolation of Drosophila proteins that bind selectively to left-handed Z-DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79, 7729-7733

Oka, Y., Shiota, S., Nakai, S., Nishida, Y. and Okubo, S. (1980): Inverted terminal repeat sequence in the macronuclear DNA of Stylonychia pustulata. Gene 10, 301-306

Paul, J. and Gilmour, R.S. (1975): The regulatory role of non-histone proteins in RNA synthesis. Ciba Found. Symp. 28 (ns): The Structure and Function of Chromatin. 181-198

Prescott, D.M., Murti, K.G. and Bostock, C.J. (1973): Genetic apparatus of Stylonychia sp.Nature 242, 597-600

Radding, C.M. (1981): Recombination activities of E. coli RecA protein. Cell 25, 3-4

Rekosh, D.M.K., Rusell, W.C., Bellet, A.J.D. and Robinson, A.J. (1977): Identification of a Protein Linked to the Ends of Adenovirus DNA. Cell 11, 283-295

Rigby, P.W.J., Diechmann, M., Rhodes, C. and Berg, P. (1977): Labeling Desoxyribonucleic Acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA Polymerase I. J. Mol. Biol. 113, 237-251

Riggs, A.D., Suzuki, H. and Bourgeois, S. (1970a): Lac Repressor-Operator Interaction. J. Mol. Biol. 48, 67-83

Riggs, A.D., Bourgeois, S. and Cohn, N. (1970b): The lac repressor-operator interaction; III. Kinetic studies. J. Mol. Biol. 53, 401-417

Rowekamp, W. and Firtel, R.A. (1980): Isolation of developmentally regulated genes from Dictyostelium. Dev. Biol. 79, 409

Roychoudhury, R., Jay, E. and Wu, R. (1976): Terminal labeling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase. Nuc. Ac. Res. 3, 101

Schleif, and Wensink (1981): Practical Methods in Molecular Biology. Springer Verlag Inc. New York

Sengbusch, P. von (1979): Molekular- und Zellbiologie. Springer Verlag Berlin Heidelberg

Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517

Spear, B.B. and Lauth, M.R. (1976): Polytene Chromosomes of Oxytricha: Biochemical and morphological changes during macronuclear development in a ciliated protozoan. Chromosoma 77, 1-13

Stein, G.H. (1976): DNA-binding proteins. Methods of Cell Biol. 15, 271-283

Steinbrück, G. (1983): Overamplification of genes in macronuclei of hypotrichous ciliates. Chromosoma (Berl.) 88, 156-163

Steinbrück, G. and Schlegel, M. (1983): Characterization of two Sibling Species of the Genus Stylonychia (Ciliata, Hypotricha): Stylonychia mytilus Ehrenberg, 1838 and Stylonychia lemnae n. sp. II. Biochemical Characterization. J. Protozoology 30 (2), 294-301

Steinbrück, G., Haas, I., Hellmer, K.H. and Ammermann, D. (1981): Characterization of Macronuclear DNA in Five Species of Ciliates. Chromosoma 83, 199-208

Swanton, M.T., Greslin, A.F. and Prescott, D.M. (1980): Arrangement of coding and noncoding sequences in the DNA molecules coding for rRNAs in Oxytricha sp. Chromosoma (Berl.) 77, 203-215

Takeda, Y., Ohlendorf, D.H., Anderson, W.F. and Matthews, B.W. (1983): DNA-binding proteins. Science 221, 1020-1026

Tjian, R. (1981): T antigen binding and the control of SV 40 gene expression. Cell 26, 1-2

Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, J. (1979): Electrophoretic Transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 4350-4354

Tsai, R.L. and Green, H. (1972): Study of Intracellulear Collagen Precursors using DNA-Cellulose chromatography. Nature (New Biol.) 237, 171

Tsao, N.N.G. and Pearlman, R.E. (1981): DNA binding proteins from Tetrahymena thermophila. Can. J. Biochem. 60, 398-407

Tu, C.P.D. and Cohen, S.N. (1980): 3'-end labeling of DNA with ^{32}P-cordycepin-5'-triphosphate. Gene 10, 177

Wang, A.H., Quigley, G.J., Kolpak, F.J., Crawford, J.L., van Boom, J.H., van der Marel, G. and Rich, A. (1979): Molecular structure of a left-handed double

helical DNA fragment at atomic resolution. Nature 282, 680-686

Wang, J.C. (1982): DNA topoisomerasen. Scientific American 247 (1), 94-109

Wesley, R.D. (1975): Inverted Repetitious Sequences in the MaDNA of Hypotrichious Ciliates. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72, 2626-2630

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann
R. Apfelbach
C. Bardele
F. Begov
F. Bentrup
W. Berthold
E. Betz
D. Bunke
H. Digel
K. Dobat
G. Drexel
W. Engels
H. Erkert
K. Fischer
H. Frey
W. Frey
H. Gabler
H. Gaude
U. Göhner
W. Gradmann
K. Grell
O. Grupe
K. Hadeler
A. Hager
W. Harder
D. Jeschke
E. Kulzer
D. Kurz
H. Lipps
W. Mayer
H. Metzner
G. Mickoleit
F. Möhres
I. Moser
W. Nakel
H. Netzel
F. Oberwinkler
R. Prinzinger
W. Rähle
K. Schmidt-König
B. Schwemmle
H. Seitz
W. Seyffert
D. Sperlich
G. Steinbrück
J. Strähle
H. Weigold

Lebenslauf

25. April 1953	geboren in Reutlingen Vater: Wilhelm Steinhilber Mutter: Elsbet Steinhilber, geb. Vollmer
1960-1964	Besuch der Grundschule in Bempflingen
1964-1967	Besuch des Gymnasiums in Metzingen
1967-1973	Besuch des Friedrich-Schiller-Gymnasiums in Pfullingen
Juni 1973	Abitur
1973-1974	Grundwehrdienst
1974-1980	Studium der Biologie und Sportwissenschaften an der Universität Tübingen
Mai 1979	Staatsexamen in Sportwissenschaften
Mai 1980	Staatsexamen in Biologie
1980	Staatsexamensarbeit bei Herrn Professor Dr. D. Ammermann am Institut für Biologie III, Abt. Zellbiologie, der Universität Tübingen
1981-1983	Doktorand bei Herrn Priv. Doz. Dr. H.J. Lipps am Institut für Biologie III, Abt. Zellbiologie, der Universität Tübingen